

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGENIEUR

par

René DELON

Ingenieur agronome



ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET COMPARATIVE DES RELATIONS
PLANTE HOTE/CHAMPIGNON DE DEUX AGENTS PATHOGENES
(Pyrenochaeta lycopersici Gerlach et Schneider, et
Colletotrichum coccodes (Wallr.) Hughes.) DES RA-
CINES DE TOMATES.



Soutenue publiquement le 20 Mai 1974 devant la Commission d'Examen. -

Membres du Jury :

Président : M. F. MANGENOT

Examineurs : MM. J. GARNIER
J. DEXHEIMER
G. M. OLA'H
O. REISINGER

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGENIEUR

par

René DELON

Ingénieur agronome



ETUDE ULTRASTRUCTURALE ET COMPARATIVE DES RELATIONS
PLANTE HOTE/CHAMPIGNON DE DEUX AGENTS PATHOGENES
(Pyrenochaeta lycopersici Gerlach et Schneider, et
Colletotrichum coccodes (Wallr.) Hughes.) DES RA-
CINES DE TOMATES.



Soutenue publiquement le 20 Mai 1974 devant la Commission d'Examen. -

Membres du Jury :

Président : M. F. MANGENOT

Examineurs : MM. J. GARNIER
J. DEXHEIMER
G. M. OLA'H
O. REISINGER



AVANT-PROPOS

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur MANGENOT qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et, en me guidant dans ce travail, n'a cessé de me prodiguer ses encouragements.

Je suis heureux de trouver ici l'occasion de lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur GARNIER dont j'ai été l'élève et qui continue à me témoigner sa bienveillance en acceptant de s'intéresser à mon mémoire et de le juger.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur DEXHEIMER qui m'a si souvent accueilli dans son service et a toujours montré le plus vif intérêt pour mon travail.

Nos remerciements respectueux s'adressent également à Monsieur le Professeur OLA'H qui a montré un grand intérêt pour mes recherches et nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Enfin cette gratitude s'adresse à Monsieur REISINGER qui a su me faire profiter de ses grandes connaissances par d'amicales et fructueuses conversations. Sous sa direction et avec son aide efficace, ce travail a pu être mené à son terme.

Que Monsieur PAVEN qui, dans le cadre de l'ENSAN, a su par son enseignement m'intéresser à la Pathologie végétale, soit assuré de ma plus vive reconnaissance.

Je remercie une fois encore tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce mémoire et tous mes collègues du laboratoire.

S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION	1
<u>PARTIE I -</u> <u>MATERIEL ET METHODES</u>	
<u>CHAPITRE I</u> <u>MATERIEL</u>	
<u>I. DESCRIPTION DES ORGANISMES PATHOGENES</u>	4
A. <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> Gerlach et Schneider	4
B. <i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) Hughes	4
<u>II. L'HOTE : <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.</u>	5
<u>CHAPITRE II</u> <u>METHODES</u>	
<u>I. OBTENTION DES SOUCHES FONGIQUES</u>	6
A. Isolement de <i>P. lycopersici</i>	6
B. Isolement de <i>Colletotrichum coccodes</i>	6
<u>II. CONDITIONS DE CULTURE ET D'INOCULATION</u> <u>DES PLANTULES DE TOMATE</u>	7
<u>III. TECHNIQUES DE PREPARATION POUR LA MICROS-</u> <u>COPIE PHOTONIQUE</u>	8

IV. <u>TECHNIQUES DE PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (M.E.T.)</u>	
A. Pour observations cytologiques	8
B. Etude enzymologique	8
1) Localisation d'activités polyphénoloxidasiques (P.P.O.)	8
a) fixation	8
b) incubation	9
c) post-fixation	9
2) Localisation des activités peroxydasiques (P.O.).....	9
C. Etude cytochimique	10
1) Localisation de substances de nature polysaccharidique	10
2) Localisation de substances protéiques (Technique de GOMORI-SWIFT 1968)	11
V. <u>TECHNIQUE DE PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (M.E.B.)</u>	12
A. Technique nécessitant une métallisation	12
B. Technique ne nécessitant pas de métallisation	12

PARTIE II -

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INTERACTION *P. lycopersici* / *L. esculentum* Var. Marmande

<u>INTRODUCTION</u>	14
<u>I. LE PATHOGENE</u>	
A. Morphologie du Champignon	14
1) le mycélium	14
2) les pycnides	16
B. Etude cytochimique	16
<u>II. ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INTERACTION</u> <u>HOTE/PARASITE</u>	18
A. Mécanisme de la pénétration des cel- lules hôtes	18
1) pénétration intercellulaire....	18
2) pénétration intracellulaire....	18
B. Variations pathologiques dans l'ultra- structure des cellules de l'hôte au cours de l'infection	19
1) la paroi	19
2) le protoplasme	20
a) le plasmalemma.....	20
b) noyaux, réticulum endo- plasmique, dictyosomes mitochondries, plastes...	20
c) les "microbodies".....	21
3) l'appareil conducteur	21
a) le xylème	21
b) le phloème	22
4) les substances denses aux élec- trons	22

III. <u>ETUDE CYTOENZYMOLOGIQUE</u>	23
A. Activités polyphénoloxidasiques.....	24
B. Activités peroxydasiques	25
IV. <u>ETUDE CYTOCHIMIQUE</u>	27
A. Application de la technique de THIERY (1967) à la mise en évi- dence des polysaccharidiques	27
B. Application de la technique de GOMORI-SWIFT (1968) pour la mise en évidence des protéines conte- nant de la cystine	29
V. <u>ETUDE AUX MICROSCOPES ELECTRONIQUES A BALAYAGE (M.E.P.) ET TRANSMISSION (M.E.T.) DES RACINES MORTES DE PLANTES ADULTES PRESENTANT LES SYMPTOMES DU "CORKY-FOOT"</u>	31
<u>CONCLUSION ET DISCUSSION</u>	33

CHAPITRE II

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INTERACTION

<u>C. coccodes / L. esculentum Var. Marmande</u>	37
--	----

<u>INTRODUCTION</u>	37
---------------------------	----

I. <u>MORPHOLOGIE DU CHAMPIGNON</u>	38
---	----

A. Le mycélium	39
----------------------	----

B. Les sclérotes	40
------------------------	----

C. Les acervules	42
------------------------	----

D. Les appressoria	44
--------------------------	----

II. <u>ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INTERACTION</u> <u>HÔTE/PARASITE</u>	46
A. Mécanisme de la pénétration des cellules corticales	46
1) cas de cellules hôtes moribondes...	47
2) cas où le champignon rencontre des cellules vivantes	48
B. Variations pathologiques dans l'ultra- structure des cellules corticales de l'hôte au cours de l'infection.....	49
1) la paroi	49
2) le cytoplasme	50
a) le plasmalemme	50
b) les organites cytoplas- miques	51
3) les vacuoles	54
4) l'appareil conducteur.....	55
5) les substances denses aux élec- trons	55
III. <u>ETUDE CYTOCHIMIQUE</u>	56
A. Mise en évidence des substances polysaccharidiques	56
B. Mise en évidence des protéines.....	57
IV. <u>ETUDE AU M.F.T. DES RACINES MORTES DE</u> <u>PLANTES ADULTES PRESENTANT DES SYMP-</u> <u>TOMES DU "BLACK-DOT"</u>	59
CONCLUSION	60
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	62
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	
<u>FIGURES ET EXPLICATIONS DES FIGURES</u>	

I N T R O D U C T I O N

Les symptômes de la maladie des racines de Tomate connue sous le nom de "Brown Root Rot" ou pourriture brune des racines ont été classés par LAST et EBBEN (1966) en trois catégories :

- 1) les lésions brunes : "brown lesions"
- 2) les lésions subérifiées : "corkiness"
- 3) les points noirs : "black dots".

Pyrenochaeta lycopersici est le champignon le plus fréquemment isolé des lésions brunes et des zones subérifiées (DAVET, 1970) et l'étude de l'interaction entre *P. lycopersici* et *L. esculentum* a fait l'objet de travaux antérieurs (DELON, 1972) dont nous présenterons un bref résumé dans le premier chapitre de la deuxième partie de ce mémoire, complété par des données nouvelles concernant les modifications d'ordre biochimique.

Par contre, on constate que dans les zones à points noirs, *Colletotrichum coccodes* est l'espèce dominante et la maladie provoquée par ce champignon phytopathogène évolue de façon tout à fait indépendante. Le complexe *C. coccodes/L. esculentum* sera donc étudié en détail dans le deuxième chapitre.

Des "points noirs", représentant des sclérotas ou acervules observables à l'oeil nu, on n'isole que *Colletotrichum coccodes* (DAVET, Loc. cit.). On a longtemps cru que *C. coccodes* était un envahisseur secondaire des lésions de "Corky root" car les symptômes apparaissent le plus souvent en fin de culture. En fait, il s'agit d'un parasite qui seul, peut provoquer des dégâts importants.

Ces deux champignons sévissent actuellement, avec une acuité variable, dans la plupart des pays producteurs de Tomate, et constituent l'un des problèmes parasitaires majeurs des cultures intensives de cette plante.

La pourriture brune des racines de Tomate a été largement étudiée du point de vue physiologique et biologique :

LAST et EBBEN, 1966 ; THERMOHLEN, 1962
BESRI, 1970 en ce qui concerne les symptômes de la maladie liée due à l'action de *P. lycopersici*.

CPESTERS et HORNEY, 1965 ; FORLOT, 1965 ;
DAVET, 1970 pour les lésions provoquées par *C. coccodes*.

Cependant, les mécanismes d'invasion des tissus et de réponse de l'hôte à ces deux parasites restent obscurs.

Pourtant du point de vue fondamental, nous croyons que l'élucidation des mécanismes pathogéniques est actuellement l'un des objectifs importants de la phytopathologie.

En effet, lorsqu'un champignon envahit une plante et établit une relation parasitaire, il s'installe en une association dont les conditions sont évidemment différentes de celles du champignon en culture pure sur milieu artificiel.

Dans les conditions naturelles, le champignon doit confronter l'hôte ; ce dernier vivant, possède des cellules hautement organisées et des barrières qui peuvent empêcher le parasite de se propager. L'hôte agit, réagit et interagit. Il peut à la fin exclure le champignon et le tuer, ou il peut être envahi aux dépens de ses tissus.

Bien que l'interface hôte/parasite puisse se situer au niveau des tissus, de la cellule, des sous-unités cellulaires et des molécules, nous limiterons notre discussion au niveau de la cellule et de ses organites. L'interface hôte/pathogène est une des régions les plus significatives pour la compréhension du mécanisme initiant la maladie et la maintenant, mais c'est aussi l'une des plus insaisissables de l'organisme malade. Elle est importante car c'est la région d'interaction directe entre l'hôte et le pathogène, ainsi qu'une zone à travers laquelle des matériaux correspondant à une réponse de l'un des partenaires sont échangés. Elle est difficilement appréhendable, car il est peu aisé de la définir et de la limiter.

Lorsque les champignons phytopathogènes pénètrent la plante-hôte, ils se heurtent à la paroi pecto-cellulosique, structure complexe qui enveloppe toujours le protoplasme des cellules végétales. Cette paroi constitue dans la majeure partie des cas, la première barrière à ces organismes et fait ainsi partie intégrante de cette zone interfaciale.

C'est pourquoi, nous nous intéresserons particulièrement dans notre travail à cette zone de confrontation et aux modifications ultrastructurales et cytochimiques intervenant au cours du processus infectieux.

Ainsi, du point de vue pratique, nous pouvons espérer que la connaissance approfondie de ces mécanismes permettra de mettre en oeuvre des moyens de lutte moins aveugles que ceux qui sont généralement utilisés actuellement.

PARTIE I

MATERIEL ET METHODES

C H A P I T R E I

M A T E R I E L

I - DESCRIPTION DES ORGANISMES PATHOGENES -

A - *Pyrenochaeta lycopersici* Gerlach et Schneider :

Le genre *Pyrenochaeta* appartient à la classe des DEUTEROMYCETES, ordre des SPHAEROPSIDALES, famille des PHOMACEES, à conidies unicellulaires et hyalines. Ce genre, décrit pour la première fois par DE NOTARIS en 1845, est très proche du genre *Phoma* et n'en diffère que par la présence de soies sur les fructifications. Il renferme actuellement environ 50 espèces, qui ont été rencontrées sur des feuilles, tiges, racines et fruits ainsi que dans le sol. Le caractère phytopathogène de la plupart d'entre elles n'a pas été bien établi jusqu'alors. Des quelques espèces connues comme étant responsables de maladies, *Pyrenochaeta terrestris* et *Pyrenochaeta lycopersici* sont les seules qui jouent un rôle économique important. *Pyrenochaeta lycopersici*, quant à lui, est plus connu sous sa forme de mycélium gris stérile, dénommée en anglais : Grey steril Fungus (G.S.F.).

B - *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) HUGHES :

L'espèce est souvent décrite sous d'autres noms, synonymes de *C. coccodes* (HUGHES, 1958). En particulier Von ARX (1957) rapporte que Mac NEILL (1955) décrit

la maladie du "Black dot" de la Tomate comme étant due à *C. atramentarium* alors que BEWLEY (1921) le dénomme *C. tabaticum*. *C. coccodes* dont la forme parfaite est encore inconnue, appartient à la classe des DEUTEROMYCETES, ordre des MELANCONIALES, famille des MELANCONIACEAE, à conidies unicellulaires et hyalines. Cependant, certains auteurs dont STEVENS (1931) obtiennent la forme ascosporee de *Colletotrichum lagenarium* par irradiation : *Glomerella lagenarium* Stev. De même la forme parfaite de *C. lindemuthianum* appartient elle aussi au genre *Glomerella*.

II - L'FOTE : *Lycopersicon esculentum* Mill. -

Appartenant à la famille des SOLANACEES et au genre *Lycopersicon* Mill. comprenant 6 espèces, *L. esculentum* est une espèce dite cultigène, c'est-à-dire issue de culture.

La présente étude a pour but d'examiner le comportement d'une variété de Tomate de serre : Marmande, sélectionnée par VILMORIN.

Cette variété est connue pour présenter une réaction de sensibilité à *Pyrenochaeta lycopersici* et *Colletotrichum coccodes*.

CHAPITRE II

METHODES

I - OBTENTION DES SOUCHES FONGIQUES -

A - Isolement de *P. lycopersici* :

L'obtention de souches de *P. lycopersici* sous sa forme de mycélium gris stérile a été réalisée à partir de racines de Tomates présentant les symptômes du "Corky-root" et suivant les techniques décrites en détail dans un travail antérieur (DELON, 1972). Le matériel fongique utilisé dans cette étude est constitué par deux souches : l'une isolée par R. SCHNEIDER en Allemagne (n° 9833), l'autre, D 30, obtenue au laboratoire.

Ces deux souches produisent dans des conditions bien définies (GERLACH et SCHNEIDER, 1966) des pycnides appartenant à l'espèce *P. lycopersici*.

B - Isolement de *Colletotrichum coccodes* :

L'isolement des souches de *C. coccodes* a été pratiqué essentiellement à partir de racines de Tomate cultivées en serre et présentant les symptômes de la maladie du "Black dot".

Nous avons suivi les indications de WILHEM (1956) en plaçant les racines nécrosées portant des acervules caractéristiques de *C. coccodes* en incubation en chambre humide. Lorsque la production de spores est suffisante, on en prélève à l'aide d'une aiguille stérile et on les dépose sur milieu P.D.A.

Une autre technique consiste, après un lavage sous un courant d'eau assez fort, à immerger les fragments d'organes 20 à 30 secondes dans une solution à 1°/‰ de chlorure mercurique. Après plusieurs rinçages dans de l'eau stérile, les fragments sont déposés sur milieu P.D.A. ou milieu à la farine d'avoine:

- composition :

- farine d'avoine 50g.
- Na Cl 5g.
- gélose 20g.
- H₂O q.s.p. 1000ml.

On stérilise le milieu à 120°C pendant 20 mn. Ce milieu permet la production d'acervules en très grand nombre, tandis que sur milieu P.D.A., le champignon développe plutôt des sclérotés.

L'incubation est effectuée à 25°C, température favorable au développement de *C. coccodes*, pendant plusieurs jours. Les souches étant fréquemment contaminées par des bactéries, on procède à leur purification selon la technique du "gel-piège" (PAYEN, 1965).

Les différents isolats sont conservés sur fragments de tubercule de Pomme de terre, disposés dans des tubes à étranglement de Roux, et stérilisés.

II - CONDITIONS DE CULTURE ET D'INOCULATION DES PLANTULES DE TOMATE -

L'obtention de plantules axéniques de 5 à 15 jours, ou la culture des plantules sur milieu naturel et leur inoculation par le mycélium gris stérile a fait l'objet d'un chapitre de notre précédent travail (DELON, 1972) et nous n'y reviendrons pas.

En ce qui concerne l'inoculation des plantules par *C. coccodes*, on procède en général par dépôt de quelques gouttes d'une suspension de conidies dans l'eau distillée stérile ou de sclérotés, au niveau de la jeune racine.

III - TECHNIQUES DE PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE -

Toutes les techniques déjà décrites (DELON, 1972) ont été reprises pour l'étude du mécanisme d'infection des racines de Tomates par *C. coccodes*, en ce qui concerne les examens anatomiques et histo-chimiques des lésions.

IV - TECHNIQUES DE PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (M.E.T.) -

A - Pour observations cytologiques :

Les échantillons fixés par le tétroxyde d'osmium à 2% dans le tampon véronal à pH 7,2 ou le tampon de Millonig à pH 7,4 ou par le permanganate de potassium à 2% dans les mêmes tampons, sont inclus dans l'épon, après déshydratation dans des solutions de concentration croissante en alcool. Les coupes ultra-fines confectionnées à l'aide de couteaux de verre, sont contrastées par le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963), puis examinées à l'aide d'un microscope électronique ZEISS EM 9S.

B - Etude enzymologique :

1) Localisation d'activités polyphénol-oxydasiques (P.P.O.) :

a) Fixation :

Des fragments de racines inoculées par les différents agents pathogènes sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 3% dans le tampon phosphate 0,02 M à pH 6,8, pendant 4 heures à la température de la glace fondante.

b) Incubation :

Après un lavage soigneux dans le tampon additionné ou non de 6% de saccharose, on incube les fragments de racine dans un milieu contenant de la dl. D.O.P.A. (0,1% dans le tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2) pendant 2 heures, à la température du laboratoire (20-22°C). Des témoins sont incubés dans un milieu privé de substrat, ou après avoir porté les objets à ébullition.

c) Post-fixation :

Après de nouveaux lavages dans le tampon à pH 7,2, on procède à une post-fixation par le tétraxide d'osmium à 1% pendant une heure à 4°C.

Après la déshydratation dans l'alcool, l'inclusion dans l'épon et la confection de coupes, l'observation est faite le plus souvent sans coloration. Cependant, afin d'obtenir des images plus contrastées (principalement pour les témoins), nous avons parfois utilisé la technique au citrate de plomb.

2) Localisation des activités peroxydasiques (P.O.) :

On procède comme pour la localisation d'activités P.P.O., seul le milieu d'incubation est modifié.

Ce dernier est composé de :

- 3-3' diaminobenzidine (D.A.B.)..... 20mg.
- tampon phosphate (0,02 M) pH 6,8.. 10ml.
- H₂O₂ à 1% 0,1ml.

L'incubation est effectuée pendant 60mn à 4°C. Des témoins sont réalisés dans le même milieu dépourvu d'eau oxygénée, ou après traitement par la chaleur, ainsi qu'en présence d'inhibiteur : KCN (0,01 M).

C - Etude cytochimique :

Les prélèvements des tissus racinaires sont effectués comme pour des observations cytologiques.

Après une fixation glutaraldéhyde post-osmiée ou uniquement par l'acide osmique, on procède à l'inclusion des spécimens.

1) Localisation de substances de nature polysaccharidique :

Les coupes ultrafines sont déposées sur des grilles en or (400 meshes) puis traitées selon la technique décrite par THIERY (1967) :

technique :

- immersion dans l'acide périodique à 1% pendant 30mn ;
- lavage soigneux à l'eau distillée ;
- traitement par la solution de thio-carbohydrazide (T.C.H.) à 0,2%, dont la préparation est la suivante :

. acide acétique	20ml.
. eau distillée	80ml.
. T.C.H.	0,2g.

Des séjours d'environ 6 heures donnent de bons contrastes pour notre matériel.

- lavages à l'acide acétique de concentration décroissante (15%, 10%, 5%, 2%), deux fois 5mn dans chaque bain ;

- rinçages à l'eau distillée (3 fois 20 mn) ;

- traitement des coupes par la solution de protéinate d'argent à 1% pendant 30mn précises.

La préparation de cette solution, ainsi que le traitement des coupes s'effectuent à l'obscurité et à température ambiante.

- rinçages à l'eau distillée, trois fois pendant quelques minutes.

Des témoins sont réalisés en remplaçant l'action de l'acide périodique par un traitement à l'eau oxygénée.

2) Localisation de substances protéiques
(Technique de GOMORI-SWIFT, 1968) :

- préparation du réactif :

solution_1 :

- . nitrate d'argent à 5% 5ml.
- . solution à 3% de méthénamine..100ml.
(HEXAMETHYLENETETRAMINE)

solution_2 :

- . acide borique à 1,44%..... 10ml.
- . borax à 1,9%100ml.

Au moment de l'emploi, on ajoute :

25ml de (1) + 5ml de (2) + 25ml d'eau distillée.

- technique :

Les coupes recueillies sur grilles en or sont traitées de la manière suivante :

Les grilles sont immergées dans le réactif disposé dans des verres de montre couverts et placés à l'étuve à 45°C, à l'obscurité ;

Le temps d'incubation est défini selon le spécimen à traiter et peut durer de 30 secondes à 24 heures. En général, pour notre matériel, un temps de 1 heure environ est utilisé ;

Les grilles sont ensuite rincées par l'eau distillée pendant 1 à 2 minutes, avec changements de bains.

V - TECHNIQUE DE PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE
ELECTRONIQUE A BALAYAGE (M.E.B.) -

A - Technique nécessitant une métallisation :

Le matériel destiné à être observé en M.E.B. est tout d'abord fixé par le glutaraldéhyde à 5%, le F.A.A., ou encore par le permanganate de potassium à 5%.

Cette fixation a essentiellement pour but de durcir les tissus afin d'éviter leur effondrement lors de la métallisation, opération qui se pratique sous vide.

Après un lavage soigneux à l'eau distillée, les spécimens sont lyophilisés ou déshydratés naturellement, puis sont collés à l'aide d'une colle liquide ou laque d'argent sur des porte-objets spécialement adaptés.

La métallisation est réalisée sous vide, par dépôt d'une mince pellicule d'or.

B - Technique ne nécessitant pas de métallisation :

Cette technique dénommée T.C.T. = Tissue conductance Technique (PANESSA et coll., 1972) a pour but de rendre les tissus végétaux (ou animaux) conducteurs par une imprégnation métallique.

Ceci permet d'éviter une métallisation de l'objet et de réduire considérablement les artéfacts dus à l'irrégularité du dépôt métallique. Il est possible d'autre part de reprendre l'objet examiné au M.E.B., de l'inclure dans des résines et de vérifier au M.E.T. la présence des structures intracellulaires comme les chloroplastes et des produits de sécrétion identifiés en M.E.B.

protocole :

Les tissus à observer sont placés dans un fixateur : glutaraldéhyde (3 à 6%) dans le tampon cacodylate 0,1 M pendant 1 à 2 jours.

La fixation s'effectue à température ambiante. Les objets sont ensuite lavés plusieurs fois dans le tampon, puis dans l'eau distillée. Lorsque toutes traces de glutaraldéhyde et tampon sont éliminées, les échantillons sont placés dans une solution d'iodure de potassium pendant 2 minutes.

réactif iodo-ioduré :

. iodure de potassium	2g.
. iode	0,2g.
. eau distillée	100ml.

L'iode se fixe préférentiellement aux constituants protéiques et à l'amidon. L'opération terminée, on rince à l'eau distillée pour enlever l'excès d'iode, puis on procède à une imprégnation par l'acétate de plomb

réactif (solution stock) :

. Na OH (en pastilles)	4g.
. acétate de plomb	1,2g.
. eau distillée	100ml.

Au moment de l'emploi, on dilue une partie de la solution stock dans trois parties d'eau distillée. La solution est filtrée sur Millipore (pores de 0,45µm) et les objets y sont immergés pendant 3mn.

Les échantillons sont rincés à nouveau dans l'eau distillée (2 à 3mn) puis lyophilisés et fixés sur un porte-objet à l'aide de laque d'argent conductrice.

L'observation au M.E.B. est effectuée sous une tension d'accélération relativement basse (5-15kv). Il est recommandé de ne pas observer les objets pendant plus d'une heure, car des phénomènes de charge se produisant, il devient impossible de poursuivre l'observation et la réalisation de bonnes images. Toutes nos micro-photographies ont été réalisées sur M.E.B. C.A.M.E.C.A./007.

PARTIE II

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

ETUDE ULTRASTRUCTURALE

DE L'INTERACTION

P. lycopersici / *L. esculentum* Var. Marmande

INTRODUCTION -

L'étude structurale et ultrastructurale des racines de Tomates parasitées par *P. lycopersici* a constitué l'essentiel de nos précédentes études (DELON, 1972 ; DELON et coll., 1973).

Après un bref rappel de nos principaux résultats concernant le mécanisme de la pénétration et les modifications ultrastructurales des cellules corticales, nous étudierons des réactions d'ordre biochimique et enzymologique provoquées par l'interaction parasitaire.

En particulier, nous tenterons d'interpréter l'augmentation des activités peroxydasiques (P.O.) et polyphénoloxidasiques (P.P.O.) observées dans les tissus parasités et les variations de la constitution chimique (polysaccharides et protéines) des principaux organites cellulaires et de la paroi de l'hôte.

I - LE PATHOGENE -

A - Morphologie du Champignon :

1) Le mycélium :

L'étude cytologique du mycélium gris stérile en culture sur milieu liquide ou

gélosé et dans les tissus de l'hôte a été entreprise dans le but de comparer l'infrastructure des cellules fongiques dans ces différents cas. D'après nos résultats précédents (DELON, 1972), nous n'avons pas remarqué de différence essentielle dans les caractéristiques des hyphes parasites et celles provenant de culture sur milieu artificiel, à l'exception de l'enveloppe fongique.

En effet, la paroi fongique apparaît plus ou moins épaisse et les hyphes intra ou inter-cellulaires possèdent les parois les plus fines (fig. 3, 4, 5 - planche II).

BONALY et REISINGER (1971) comparant l'épaisseur des parois de levures en modifiant les compositions des milieux de culture, constatent qu'une variation du rapport C/N du milieu et en particulier une augmentation de la proportion de substances azotées, accroît notablement l'épaisseur des parois.

Rappelons encore que les cloisons (S) des hyphes de *P. lycopersici* (fig. 2, pl. II) sont semblables au septum typique des Ascomycètes et Deutéromycètes avec des affinités d'Ascomycètes, avec un pore central au niveau duquel se situent des "bouchons" correspondant aux corps de Woronin (cw).

L'état coenocytique maintenu sur l'ensemble de l'appareil végétatif grâce aux perforations septales pourrait être un facteur défavorable dans des conditions écologiques difficiles. En fait, la possibilité de fermeture presque instantanée par le jeu des corps de Woronin, rend ces structures hautement adaptées à la survie. Une rupture mécanique provoquée sur la paroi latérale d'une cellule entraînant la mort de celle-ci, n'altère pas la vie des loges voisines dont les cloisons se bouchent (fig. 1, pl. III). La loge hyphale blessée est ainsi séparée de l'ensemble du mycélium.

Nous avons encore remarqué dans les hyphes intracellulaires et en particulier dans les zones apicales ou jeunes, la présence d'une membrane cytoplasmique très convolutive. Des formations lomasmiques (lo) et de nombreuses vésicules paraissent

indiquer une activité sécrétoire importante durant le processus infectieux (fig. 1 pl I, fig. 2 pl. VI).

2) Les pycnides :

Selon nos observations précédentes effectuées à l'aide des microscopes photonique et électronique (DELON, 1972), les pycnides sont constituées de 5 à 6 couches de cellules stériles (fig. 4, pl. IV) qui forment une enveloppe protectrice. La densité électronique de la paroi hyphale composant cette enveloppe diminue de l'extérieur vers la lumière de l'organe et correspond sans doute à une différence dans la mélanisation (fig. 3, pl. IV).

Des conidiophores plus ou moins longs et ramifiés partent de la couche de cellules fertiles et internes (fig. 1 et 4, pl. IV). Ils sont porteurs d'éléments sporogènes ayant les caractéristiques des phialides (fig. 5 et 6, pl. IV).

B - Etude cytochimique :

Notre but est de localiser et d'évaluer l'importance de certains composés polysaccharidiques et protéiques de la paroi d'hyphes issues de culture en milieu liquide.

Nous avons employé la technique de THIERY (1967) pour la mise en évidence des substances de nature polysaccharidique et la technique de GOMORI-SWIFT (1968) qui serait spécifique des protéines contenant de la cystine.

Bien que la spécificité de ces deux techniques envers les produits complexes des parois fongiques et les constituants végétaux soit discutée, on peut néanmoins admettre qu'elles apportent des données très intéressantes concernant la stratification des parois fongiques et autres modifications des constituants cellulaires.

L'emploi de la technique de GOMORI-SWIFT pour l'étude des hyphes de *P. lycopersici* révèle tout d'abord la nature fortement protéique de la couche A.

La couche B présente une réaction nettement positive bien que plus faible (fig. 3 et 4, pl. III) démontrant ainsi la présence de précurseurs mélaniques comme chez *Phialophora richardsiae* (OLAH et REISINGER, 1974).

Au niveau des pores septaux, on remarque également que les corps de Woronin sont fortement marqués par la coloration, alors que leur membrane limitante ne l'est pas (fig. 3, pl. III).

Au contraire, la technique de Thiéry contraste intensément cette membrane, ainsi que le plasmalemma (fig. 1, pl. III). Le glycogène présent dans certaines loges apparaît aussi très contrasté (fig. 2, pl. III).

Quant à la paroi, l'analyse des images obtenues montre que la couche A est en partie polysaccharidique et réagit nettement au réactif TCH-Ag, après action de l'acide périodique. Il faut noter cependant que cette pellicule présente, déjà en l'absence de tout contrastant, une densité plus élevée que la couche B.

Ainsi, comme pour REISINGER et OLAH (1974), il nous est difficile d'établir avec certitude la cause de son imperméabilité élevée par rapport à la couche sous-jacente.

Nous noterons encore que les composés denses aux électrons constituant la zone mucilagineuse (zm) riche en substances de caractère mélanique et situés entre les hyphes (fig. 2, pl. III) sont moins marqués par les réactifs de Thiéry que la couche A, alors que ces deux zones réagissent de façon identique avec la technique de Gomori-Swift (fig. 4, pl. III),

II - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INTERACTION HOTE/PARASITE -

A - Mécanisme de la pénétration des cellules-hôtes :

1) Pénétration intercellulaire :

Les hyphes de *P. lycopersici* peuvent se propager dans les méats et entre les cellules en séparant les parois au niveau de la lamelle mitoyenne. Cette propagation intercellulaire s'accompagne généralement de la formation d'une zone dense aux électrons en avant du champignon, ce qui semblerait prouver une certaine activité pectinolytique (fig. 2, pl. V).

L'action mécanique ne serait donc pas le seul mécanisme responsable de la pénétration entre les cellules.

2) Pénétration intracellulaire :

Les premières étapes de l'infection permettent d'observer une réaction immédiate des cellules corticales vivantes par la formation de dépôts pariétaux (fig. 1 et 2, pl. I). Nous avons décrit avec précision ces dépôts pariétaux que nous avons dénommés "lignitubers" (DELON, 1972 ; DELON et coll., 1973), en reprenant les termes utilisés par FELLOWS (1928) et plus récemment par GRIFFITHS (1971) et HOLLAND et FULCHER (1971).

Le franchissement des parois cellulaires, comme celui des lignitubers par *P. lycopersici* suppose deux processus :

- l'un mécanique : augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de l'hyphe infectante ;
- l'autre enzymatique : en accord avec EDWARDS et coll. (1970), nous remarquons que l'activité

des enzymes sécrétées par l'extrémité apicale de l'hyphe infectante est confinée à une étroite zone. Ces enzymes ne semblent pas actives à des distances supérieures à $0,1\mu\text{m}$, comme le prouve la présence d'une zone plus dense autour du point de pénétration (fig. 1, 3 - pl. V).

Ceci semblerait prouver l'existence d'une cellulolyse : d'ailleurs KILBERTUS et coll. (1973) étudiant la dégradation de la cellulose in vitro, expliquent l'apparition de plages très denses aux électrons dans les fibres de cellulose en contact avec une souche de *Trichoderma viride*, par la présence des protéines de la cellulase. Celles-ci se combineraient avec l'acide osmique, d'où la plus grande opacité aux électrons.

Dans les cellules à contenu cytoplasmique fortement altéré, ou totalement disparu à la suite de l'action nécrosante à distance du pathogène, le champignon pénètre directement la paroi sans formation de lignitubers (fig. 5, pl. V).

Ceux que l'on peut observer semblent parfois incomplètement édifiés, comme peut le suggérer leur structure hétérogène ; ils ont été probablement élaborés avant la désorganisation complète de la cellule.

B - Variations pathologiques dans l'ultra-structure des cellules de l'hôte au cours de l'infection :

Au cours du processus infectieux, des changements s'opèrent dans le métabolisme de l'hôte et du parasite.

Dans les tissus infectés de l'hôte, nous remarquons (DELON, 1972) l'existence de remaniements cellulaires, la migration et l'augmentation du nombre de certains organites et même l'apparition de constituants anormaux.

1) La paroi :

La paroi des cellules en voie de pénétration ne présente pas de profonds changements

dans sa structure ; seule, la zone immédiatement adjacente à l'hyphe révèle des altérations d'origine lytique (fig. 1 et 3, pl. VI).

Quant aux parois des cellules à protoplasme profondément dégradé, leur opacité aux électrons augmente et leur structure fibrillaire disparaît. Leur épaisseur est artificiellement accrue par un dépôt de substances denses (fig. 4, pl. X).

2) Le protoplasme :

a) le plasmalemme :

Au sein du protoplasme, le plasmalemme (mc) généralement étroitement accolé à la paroi, devient plus ou moins convoluté dans les tissus parasités.

De nombreuses vésicules (lo) apparaissent entre celui-ci et la paroi et correspondent aux corps pariétaux décrits par MARCHANT et ROBARDS (1968). Ces structures sont absentes ou rares chez les cellules de plantes saines et sont considérées comme une réponse au parasitisme, sans toutefois être associées à l'état résistant ou sensible (EHRlich et coll., 1968).

b) noyaux, réticulum endoplasmique, dictyosomes, mitochondries, plastes :

Quant aux organites tels que noyau (N), réticulum endoplasmique (RE), dictyosomes (Go), mitochondries (mi) (fig. 1, pl. I et fig. 1, 2 et 4, pl. VI), ils ne semblent pas affectés de changements structuraux importants. Cependant, on observe leur migration vers le lignituber, témoignant ainsi d'une activité métabolique intense à ce niveau.

De même, la présence de nombreuses vésicules (ve) d'origine golgienne, ou provenant du réticulum endoplasmique représente peut-être une étape de transition dans le transport de matériaux vers ou depuis le lignituber (fig. 1, pl. I et fig. 1, pl. VI).

Les cellules racinaires de plantules saines renferment de nombreux plastes amyli-fères ; par contre, les cellules de racines parasitées présentent des plastes où l'amidon est toujours absent. Ce fait a d'ailleurs été observé par PINON et coll. (1972) dans les chloroplastes de cellules de limbes de céréales infectés par *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, mais ces auteurs montrent qu'après une courte éclipse, l'amidon redevient abondant lorsque le parasite s'apprête à fructifier.

Nous n'avons pas observé de phénomène semblable, la disparition de l'amidon paraissant définitive, ni de modifications importantes de l'ultrastructure de ces plastes. Il est probable que les amyloplastides des cellules de racines saines ne jouent pas un rôle aussi important que les chloroplastes dans le parasitisme.

c) les "microbodies" :

L'existence de "microbodies" avec une région d'aspect cristallin (fig. 5 et 6, pl. VII) dans les cellules vivantes ou en voie de dépérissement situées à proximité de zones contenant le parasite, pourrait correspondre à l'augmentation des activités peroxydasiques que l'on observe dans ces tissus.

En effet, des études biochimiques et cytochimiques ont permis de déceler chez ces organites d'importantes activités enzymatiques (JENSEN, 1968) et en particulier, une activité peroxydasique (MARTY, 1971) ou catalasique (MATSUSHIMA, 1971).

2) L'appareil conducteur :

a) le xylème :

Les hyphes de *P. lycopersici* sont fréquemment observées dans le lumen

d'éléments vasculaires chez les plantules ou racinelles de plantes âgées.

L'altération la plus évidente est la formation de tyloses constituées de travées denses aux électrons, de 0,2 à 1 µm de large, recouvrant les parois lignifiées et obstruant les vaisseaux (fig. 7, pl. VII).

b) le phloème :

les tubes criblés ne paraissent pas recéler de mycélium, mais on peut remarquer que la densité des protéines fibrillaires (pf) au niveau des perforations apparaît plus importante dans les racines attaquées (fig. 3 et 4, pl. VII).

3) Les substances denses aux électrons :

La présence de substances denses aux électrons n'a été observée que dans les cellules à contenu protoplasmique fortement altéré, renfermant le parasite et situées à proximité de cellules saines. Ces substances n'ont jamais été observées dans les cellules saines, ni dans les cellules sénescents ne contenant pas d'hyphes.

D'autre part, des cellules parasitées peuvent ne pas contenir de substances denses aux électrons.

Ces substances sont de types morphologiques différents. On distingue principalement (DEFLON et coll., Loc. cit) (fig. 4, pl. X) :

- P₁ : particules fines de 10 à 30 nm, se répartissant irrégulièrement tout autour des parois et des hyphes ;

- P₂ : particules diffuses, résultant peut-être de l'agglomération des premières et formant des amas plus ou moins homogènes ;

- P₃ : particules plus importantes,

relativement sphériques (0,3 à 0,8 μm), présentant des couches concentriques de densité différente et réparties tout le long des parois cellulaires de l'hôte.

Ces différentes structures particulières cohabitent en général dans les cellules. Leur origine et leur constitution chimique sont inconnues, bien qu'il nous semble que ces particules soient riches en protéines contenant des ponts disulfures, car comme nous le verrons dans un paragraphe ultérieur, ces particules et surtout les particules P_3 réagissent fortement avec les réactifs de Gomori-Swift.

Si leur signification est également indéterminée, on peut remarquer qu'elles sont liées à la présence du champignon dans la cellule. Il est donc possible de les interpréter comme une réaction de l'hôte qui tente d'inhiber le parasite par la diffusion de substances toxiques produites par les cellules saines immédiatement adjacentes aux cellules infestées, à travers la paroi.

Ces substances pourraient être oxydées par les enzymes du parasite et constituer ainsi des substances denses aux électrons, ou il peut s'agir de produits d'altération du cytoplasme.

III - ETUDE CYTOENZYMOLOGIQUE -

Au niveau cellulaire, l'interaction initiale entre un agent pathogène et l'hôte provoque une modification fondamentale du métabolisme de l'organisme parasite et, dans une certaine mesure, de celui du parasite.

Pendant le processus d'infection, l'hôte réagit selon une succession organisée de phénomènes histologiques et biochimiques. Notre but est ici de mettre en évidence une relation entre les activités

* Etude faisant l'objet d'une publication dans Phytopathol. Zeitschrift acceptée en Janv. 1974.

polyphénoloxydasiques et peroxydasiques des tissus racinaires et la présence du parasite.

En effet, si les P.P.O. (polyphénol-oxydases) sont supposées jouer un rôle important dans les phénomènes de défense des plantes (FARKAS et KIRALY, 1962), les peroxydases pourraient y avoir une part non négligeable (JENNINGS et coll., 1969; RAUTELA et PAYNE, 1970). Ces mêmes auteurs et beaucoup d'autres (par ex. : FEHRMANN et DIMOND, 1967) ont essayé d'établir une relation entre l'augmentation de l'activité de ces enzymes chez les plantes malades et les mécanismes de résistance.

A - Activités polyphénoloxydasiques :

L'examen en microscopie photonique de coupes de racines présentant des épaisissements liégeux montre une coloration brune intense des tissus corticaux et libériens après incubation dans le catéchol ou la dl. D.O.P.A. (fig. 1, pl. VIII). A l'inverse, les coupes effectuées dans des racines saines ou les portions sans lésions de plantes contaminées ne présentent qu'une très faible coloration brune. Seule la zone superficielle du cortex et les couches périphériques du xylème réagissent positivement (fig. 1, pl. VIII), mais de façon moins intense que les zones parasitées.

En ce qui concerne les témoins (après ébullition des coupes pendant 10 mn ou en l'absence de substrat) aucune coloration n'est observable. Par contre, l'azoture de sodium n'a qu'un effet inhibiteur partiel et une faible coloration brune est perceptible principalement pour des temps d'incubation supérieurs à 8 heures.

L'activité P.P.O. reste localisée aux zones parasitées, comme le confirme l'expérience réalisée sur une jeune plantule inoculée ponctuellement (fig. 4, pl. VIII). Après traitement par la dl. D.O.P.A. ou le catéchol, seule la partie infectée et les cellules

immédiatement adjacentes présentent une forte activité D.O.P.A.-oxydase et catécholase.

Du point de vue ultrastructural, la différence fondamentale entre tissus sains et parasites est localisée au niveau des parois cellulaires. Celles-ci présentent une densité importante aux électrons, sur tout ou partie de leur surface chez les cellules attaquées, incubées en présence de D.O.P.A. (fig. 6, pl. VIII). Cette réaction n'apparaît pas dans les tissus sains incubés en présence du substrat (fig. 8, pl. VIII).

Cependant, on ne note ni dans le cytoplasme, ni dans le système vacuolaire de réponse aussi nette.

B - Activités peroxydasiques :

En microscopie photonique, la technique utilisant la benzidine appliquée aux racines parasitées ou non, montre des activités peroxydasiques (= P.O.) caractérisées par une coloration bleu-foncé de l'ensemble des tissus. Il n'est ainsi pas possible de différencier les tissus sains de ceux qui sont infectés par le champignon.

Au contraire, l'emploi de la technique aux zinc-leucos (LISON, 1960) fait ressortir comme dans le cas de la P.P.O., des activités P.O. plus intenses chez les fragments de racines présentant les symptômes de la maladie liéeuse (fig. 3, pl. VIII).

Dans le cas d'inoculation ponctuelle des plantules, comme pour les P.P.O., on remarque que la zone située autour du point d'infection est colorée en rouge intense, caractéristique de la réaction positive (fig. 5, pl. VIII). On note également des activités P.O. relativement fortes au niveau des méristèmes apicaux des racines latérales (fig. 5, pl. VIII). Sur une coupe de racine de plante adulte (4-6 mois) saine, traitée par la technique de LISON (fig. 2, pl. VIII), les activités P.O. ne sont décelables que dans la zone subérisée de l'épiderme, ainsi qu'au niveau de l'endoderme et du phloème. Cependant, la coloration observée est nettement plus faible que celle de sections de racines envahies par le parasite. Chez ces dernières, l'ensemble du cortex et des tissus libériens est intensément coloré en rouge vif. Les images obtenues en M.E.T. révèlent comme dans le cas de la P.P.O., une activité particulièrement intense au niveau des parois pecto-cellulosiques. Les activités P.O. au sein du cytoplasme ne diffèrent pas notablement de celles de cellules de racines saines.

Comme POUX (1972) et HEPLER et coll. (1972) examinant respectivement des méristèmes de plantes saines (*Cucumis sativus* L.) et des éléments de trachées de *Coleus*, nous avons pu remarquer des dépôts denses aux électrons dans les dictyosomes, le plasmalemme, les mitochondries et les vacuoles. Nous rappellerons que d'après POUX (loc. cit.), ces activités apparaissent après une incubation à froid (4°C), correspondraient vraisemblablement à des peroxydases *sensu stricto*. Nous n'avons pas observé d'activité P.O. des "microbodies" (= Peroxysomes) que l'on met en évidence dans les cellules vivantes proches du parasite.

Ceci peut s'expliquer par les conditions expérimentales employées. En effet, POUX (loc. cit.), MENDGEN et FUCHS (1973) faisant varier les conditions de pH et de température de l'incubation, observent une réaction positive des "microbodies". Cette réaction ne se produit qu'après incubation prolongée à chaud et est optimale en milieu alcalin (pH : 9).

IV - ETUDE CYTOCHIMIQUE -

La pénétration des cellules corticales de l'hôte par le parasite provoque des altérations de la paroi et l'étude histochimique en microscopie photographique (DELON, loc. cit.) nous a révélé l'existence de modifications chimiques des parois au niveau des points d'infection.

Notre but est ici de caractériser, par l'emploi de techniques adaptées à la microscopie électronique, la nature de ces changements.

A - Application de la technique de THIERY (1967) à la mise en évidence des polysaccharides :

Nous n'envisagerons que les données cytochimiques relatives aux différents territoires cellulaires riches en polysaccharides et intéressant l'interaction plante-hôte/parasite.

La paroi est, rappelons-le, un édifice complexe dont les constituants majeurs sont de nature glucidique. La matrice est une association d'hémicelluloses variées et de substances apparentées aux pectines dont la localisation et les proportions varient avec l'âge et le type cellulaire

L'utilisation de la technique acide périodique-TCH-protéinate d'argent avec des temps de traitement par le TCH d'environ 5 à 6 heures, fournit un contraste uniforme de l'ensemble de la paroi pecto-cellulosique des cellules saines.

L'observation des parois de cellules parasitées montre une coloration légèrement plus intense et surtout plus hétérogène, suggérant l'existence de lyse partielle de la paroi en certains endroits, de l'accumulation de composés polysaccharidiques plus réactifs en d'autres points (fig. 3 et 4, pl. IX). Les dépôts ap-

paraissant contre les parois dans les cellules en voie de pénétration sont très légèrement plus contrastés que la paroi, cependant dans certains cas, une couche répondant nettement aux réactifs de THIERY recouvre les dépôts pariétaux (fig. 4, pl. IX).

BOSSANYI (1973) étudie la pénétration de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* ; il note l'absence de réaction au site de pénétration, définissant ainsi une sorte de perforation apparente dans la paroi des deux organismes. Au contraire, *P. lycopersici* ne provoque pas de phénomène semblable.

Si les dépôts pariétaux ne répondent pas positivement à la mise en évidence des polysaccharides, on remarque des précipités de sels d'argent répartis irrégulièrement et révélant ainsi la présence de certains polysaccharides en quantité peu importante (fig. 5, pl. IX).

Cependant, il convient de remarquer que les stades observés correspondent à la pénétration de cellules moribondes, incapables de réagir à une infection ; il n'est donc pas possible d'en tirer des conclusions quant à la pénétration de cellules vivantes, comme c'est le cas chez *Puccinia graminis*.

La paroi de l'hôte diffère de celle de l'organisme pathogène. La technique de THIERY met en évidence une faible proportion de groupements vic-glycols dans la paroi de l'hôte par rapport à celle de l'agent pathogène (fig. 1 et 5, pl. IX).

L'enveloppe fongique réagit fortement à la méthode de mise en évidence des polysaccharides et on distingue nettement la couche A externe de la couche B qui est en général plus claire.

Le plasmalemma et les formations multivésiculaires du parasite offrent une réactivité particulièrement importante, ce qui permet de supposer une forte activité sécrétrice de ces structures (fig. 1, pl. IX).

La portion de l'hyphe infectante pénétrant le dépôt pariétal ou la paroi (fig. 2 et 4, pl. IX) possède une paroi et un plasmalemme peu marqués, indiquant ainsi une modification chimique de cette portion de l'hyphe.

B - Application de la technique de GOMORI-SWIFT (1968), pour la mise en évidence des protéines contenant de la cystine :

Cette technique, mise au point par SWIFT (1968) pour l'étude de protéines à groupements S-S des cheveux, apparaît dans ce cas assez spécifique, bien que l'auteur reconnaisse que la mélanine réagit également : il y aurait réduction de l'argent méthénamique par les sous-unités hydroquinoïdes des macromolécules de mélanine.

D'autres fausses réactions peuvent être observées dans des conditions particulières de pH et de température d'incubation.

L'auteur conclut que dans les conditions alcalines de pH, la mise en évidence des acides aminés des cheveux humains comprenant de la cystine est très utile mais la réaction chimique conduisant à ces résultats est inconnue.

Il nous a donc paru extrêmement intéressant d'appliquer cette technique à l'étude de la distribution de ce type de protéines dans les cellules parasitées.

Nous n'avons étudié ici que le cas de l'interaction de *P. lycopersici*/L. *esculentum* chez des cellules profondément altérées où le protoplasme cellulaire n'est plus identifiable que sous forme de substances denses aux électrons.

Nous remarquerons tout d'abord que les parois de l'hôte sont fortement contrastées ; on peut donc supposer des modifications de la composition chi-

mique dans le sens d'une augmentation du pourcentage des protéines (toxines, enzymes, etc...). Quant aux parois fongiques, nous considérerons deux cas :

1) hyphe en voie de sénescence (fig.1, pl. X) : la production de substances de type mélanique semble perturbée et la paroi apparaît claire aux électrons ainsi que l'ensemble du cytoplasme.

2) hyphe encore vivante dans des cellules hôtes mortes (fig. 3, pl. X) : la paroi conserve son aptitude à se mélaniser.

Les lignitubers présentent une très forte réaction positive et comme nous le verrons pour *Colletotrichum coccodes*, il pourrait s'agir de l'accumulation de substances protéiques produites par l'hôte ou le pathogène (fig. 3, pl. X). On note cependant, autour de l'hyphe du parasite, une coloration moins importante suggérant une action de celui-ci sur ces substances de type protéiques.

En ce qui concerne les substances denses aux électrons, et en particulier les particules de type P_3 , il est intéressant de noter qu'ils réagissent aussi à la méthode de Gomori-Swift (fig. 2, pl. X) : la densité va en croissant de l'intérieur vers l'extérieur, alors que pour une coloration par le citrate de plomb (fig. 4, pl. X), on note le contraire ; il s'agit peut-être de substances protéiques simples se complexant par la suite et ne possédant plus de fonction S-S libre et ainsi ne pouvant plus réduire l'argent méthénamique, mais ce ne sont que des hypothèses.

En effet, l'application des techniques cytochimiques, que ce soit le réactif de THIERY ou le réactif de GOMORI-SWIFT, ne permet pas à l'heure actuelle d'identifier avec précision les produits de réaction par manque de spécificité. Cependant, les résultats obtenus par l'emploi de ces techniques nous révèlent certains caractères de l'interaction hôte/parasite, qui ne nous apparaissent pas avec une simple coloration par le citrate de plomb ou l'acétate d'uranyle.

Il nous faudra donc dans un second temps, et c'est le but de nos travaux futurs, identifier les substances répondant aux divers réactifs par l'emploi d'enzymes spécifiques, détruisant ces produits.

V - ETUDE AUX MICROSCOPES ELECTRONIQUES A BALAYAGE (M.E.B.)
ET TRANSMISSION (M.E.T.) DES RACINES MORTES DE PLANTES
ADULTES PRESENTANT LES SYMPTOMES DU "CORKY-ROOT" -

En microscopie à balayage, une des caractéristiques de la maladie nous est révélée ; c'est la démarcation nette entre le cylindre central et la zone corticale (fig. 1, pl. XII).

Si l'attaque du cortex est générale et ne fait pas de doute, on pourrait penser que le cylindre central est indemne de toute invasion parasitaire.

Il n'en est rien et, (fig. 3, pl. XII), on peut observer de nombreux filaments mycéliens traversant les vaisseaux lignifiés. Des coupes de ces racines observées en M.E.T. montrent bien l'existence de ces hyphes qui dégradent les parois lignifiées et sont présentes dans les cavités naturelles. Remarquons toutefois que les hyphes observées sont très altérées (fig. 2, pl. XII).

Au sein du cortex, bien qu'en M.E.B., de nombreux filaments mycéliens apparaissent (fig. 5, pl. XI), en M.E.T. de nombreuses cellules semblent ne pas en contenir.

Leur protoplasme est profondément altéré et aucun organe n'y est reconnaissable, sauf les "microbodies" dont le noyau cristallin réagit fortement à la technique de GOMORI-SWIFT (fig. 4 et 6, pl. XI). Les parois cellulaires très dégradées (fig. 3, pl. XI) sont cependant bien marquées par les réactifs de la technique de THIERY (fig. 2 et 3, pl. XI).

L'apparition des bactéries s'attaquant elles aussi aux parois végétales et fongiques constitue l'étape post-parasitaire et représente la phase de biodégradation des racines dans le sol sous l'influence de la microflore saprophyte (fig. 5, pl. XII). Dans des études en cours, HAFRANGER et REISINGER (communication personnelle) sur la conservation de *P. lycopersici* dans le sol, entre deux cultures successives de Tomate, constatent que s'il est toujours possible d'isoler *P. lycopersici* dans les racines ayant séjourné 2 à 3 mois dans le sol après la récolte, de nombreux champignons saprophytes et bactéries contribuent à la désintégration des tissus racinaires et ainsi détruisent des niches écologiques favorables à sa conservation.

BFSRI (loc. cit.) conclut dans ses travaux que les racines de Tomate offrent un site privilégié à la conservation de *P. lycopersici* perdant lentement sa vitalité. Cette possibilité est importante pour la survie du champignon, car dans le sol, il est incapable de croître et il est dépourvu de toute aptitude à la colonisation saprophytique, contrairement à d'autres parasites de la Tomate.

CONCLUSION et DISCUSSION :

Il est admis par de nombreux auteurs dont THERMOHLEN (1962), DAVET (1970) et BESRI (1970) que *Pyrenochaeta lycopersici* est le principal responsable des lésions liégeuses des racines de Tomate.

Ce champignon gris stérile est caractérisé par une très grande variabilité, surtout en ce qui concerne la coloration des colonies, la formation des microsclérotés, la croissance, l'aptitude à produire des pycnides et la pathogénie.

L'étude ultrastructurale de la pénétration du parasite dans les cellules corticales montre différentes réactions de l'hôte. En effet, l'interaction initiale entre l'agent pathogène et l'hôte au niveau cellulaire provoque une modification fondamentale du métabolisme de l'hôte, et dans une certaine mesure de celui du parasite. Puis, les altérations se diversifient, s'amplifient.

Le développement de la maladie résulte des effets réciproques et continus de ces activités métaboliques modifiées.

Un agent causal particulier, tel *P. lycopersici*, induit sur un hôte donné : *L. esculentum*, une séquence bien définie et reproductible de symptômes maladiques. Il en résulte des manifestations de l'agent pathogène lui-même.

L'approche du mycélium parasite d'une cellule de l'hôte provoque chez celle-ci des modifications s'exprimant au niveau de l'ultrastructure par l'apparition de corps pariétaux et une déformation du plasmalemme, ainsi qu'une vacuolisation importante repoussant le cytoplasme contre les parois.

Dans le cytoplasme, on note que le nombre des mitochondries augmente, qu'elles deviennent plus petites et possèdent de nombreuses crêtes.

Le réticulum endoplasmique long et flexueux, de type granulaire, se dispose parallèlement au plasmalemme.

Le stade suivant voit la formation, au site de pénétration, de papilles possédant une matrice amorphe.

Cette réaction cellulaire s'observe couramment chez de nombreuses plantes parasitées par *Alternaria*, *Diplodia*, *Verticillium*, *Fusarium* et semble être produite par le protoplasme de la cellule hôte, indiquant une réponse à l'invasion fongique.

La pénétration des parois et dépôts pariétaux paraît s'effectuer par voie enzymatique comme le prouve l'existence d'une aire plus dense aux électrons confinée dans une étroite zone immédiatement adjacente à la surface de l'apex de l'hyphe pénétrante, suggérant une lyse de la paroi à cet endroit ; cependant, il ne faudrait pas négliger l'action mécanique des hyphes.

Lorsque le protoplasme est profondément dégradé, le champignon émerge des lignitubers envahit la cellule morte et se dirige vers une autre cellule où il provoquera, si elle est encore vivante, les mêmes réactions que précédemment. Les cellules dégénérées contiennent souvent des substances denses aux électrons, dont l'origine et le rôle ne sont pas connus ; elles pourraient provenir de l'altération du matériel cytoplasmique, de l'oxydation par le champignon de composés excrétés par les cellules vivantes voisines ou de substances produites par le parasite lui-même.

L'action de *P. lycopersici* sur l'hôte se manifeste également au niveau de l'ultra-structure par l'apparition dans le cytoplasme des cellules voisines de tissus parasités, de corps à centre cristallin, morphologiquement semblables aux "microbodies". Ces derniers peuvent exprimer des modifications des activités enzymatiques particulières.

De plus, on peut remarquer dans certaines cellules voisines de zones malades, la présence dans les vacuoles de structures fibrillaires en forme d'étoiles, résultant probablement de l'action du parasite.

L'augmentation de l'activité P.P.O.

et P.O. dans les racines est également caractéristique de l'invasion fongique. Cependant, si son importance dans le développement de la maladie est incontestable, son rôle physiologique est loin d'être élucidé.

On peut néanmoins faire quelques remarques :

Les activités P.P.O., d'après nos résultats en microscopie photonique, apparaissent comme étant localisées au niveau des parois. Toutefois, une activité protoplasmique semble exister, mais paraît moins importante. L'étude au M.E.T. confirme ces faits.

Du point de vue des peroxydases, leur activité est étroitement liée à la présence du parasite, leur localisation apparaît comme étant pariétale et cytoplasmique, bien que la réaction se situe de façon plus marquée au niveau des parois de l'hôte en contact avec les hyphes du champignon.

D'ailleurs, MENDGEN et FUCHS (1973) étudiant les activités P.O. de *Phaseolus vulgaris* après infection par *Uromyces phaseoli typica*, ont observé une couche présentant ces propriétés enzymatiques et qui semble située à l'extérieur de la paroi cellulaire. Cette couche s'épaissit parfois, principalement lorsque les hyphes intercellulaires sont en contact avec la paroi. Les activités P.O. liées à cette paroi peuvent être en relation avec une modification de sa composition chimique : lignification ou subérisation. Ces derniers phénomènes sont caractéristiques de la maladie à son stade final (apparition de liège). On peut même penser qu'il s'agit là d'isoperoxydases liées à la paroi (DELON, 1974).

L'existence d'importantes activités P.O. et P.P.O. au sein de la paroi pecto-cellulosique de l'hôte, confirme le fait qu'il s'y établit une barrière biochimique tendant à s'opposer à la propagation du parasite.

En effet, d'après HEPLER et coll. (1972) et de nombreux autres auteurs, la similitude de localisation des peroxydases et de la lignine dans les parois des éléments de la trachée, appuie l'hypothèse selon laquelle l'enzyme participerait à la lignification. Déjà BABA (1955) et Van FLEET (1962) avaient remarqué

que cette activité correspondait à une modification de la structure de la paroi et en particulier, à sa lignification et à sa subérisation.

En ce qui concerne l'étude cytochimique, la mise en évidence des polysaccharides révèle des différences de composition entre paroi fongique et paroi de l'hôte ainsi que d'autres sites particulièrement réactifs. Nous n'observons pas de profondes perturbations de la structure polysaccharidique au niveau du point de pénétration ; cependant, le fait de n'avoir pratiqué les observations que dans des cellules altérées, donc incapables de réagir à l'infection, pourrait expliquer cette absence de modification.

Du point de vue de la mise en évidence des protéines contenant de la cystine, même si la technique employée n'est pas très sélective, on remarque que les parois des cellules infectées et les lignitubers sont particulièrement réactifs. Ces résultats confirment que comme dans le cas des activités P.O. et P.P.O., la paroi et les dépôts pariétaux sont le siège de modifications biochimiques qui aboutissent dans certains cas, à détruire les hyphes du pathogène.

Cependant, malgré toutes ces "barrières" s'opposant à la progression du parasite, les hyphes atteignent dans certains cas (racines jeunes) les vaisseaux du xylème où elles provoquent des formations identiques aux tyllés observables dans les racines infectées par des *Fusarium*. Ces tyllés peuvent obstruer le système conducteur, perturbant l'alimentation de la plante et contribuer sinon à sa mort, du moins à son flétrissement.

Ce flétrissement a déjà été signalé par PREECE (1964) comme étant un des symptômes de la maladie des racines liégeuses dans le cas de forte invasion.

CHAPITRE II

ETUDE ULTRASTRUCTURALE

DE L'INTERACTION

C. coccodes / L. esculentum Var. Marmande

INTRODUCTION -

BEWLEY en 1916 signalait pour la première fois une infection sur Tomate, due à *Colletotrichum tabaticum* (sym. : *C. coccodes*). Il s'agissait d'une attaque d'abord localisée au niveau des racines et qui évoluait ultérieurement jusqu'à produire des symptômes sur fruits.

Cependant, les études qui suivirent furent principalement orientées sur les dégâts occasionnés aux fruits et il semble que cette anthracnose soit produite par une espèce différente, en particulier : *Colletotrichum gloesporioides* (syn : *C. phomoides*).

Les deux champignons diffèrent morphologiquement et d'après Von ARX (1957), certains auteurs ont souvent confondu les deux espèces.

C. coccodes a principalement été signalé sur *Solanum tuberosum* L., *Lycopersicon esculentum* L., *Cannabis sativa* L.

Du point de vue économique, les dégâts peuvent être importants et atteindre jusqu'à 60% des

plantes (MAC NEILL, 1955 - JAKUBCZYK, 1962) en serres ou en champs.

C. coccodes peut être mis en évidence dès les premiers symptômes de la pourriture brune des racines, mais il apparaît surtout en fin de culture.

La coexistence sur une même racine des deux maladies, l'une provoquée par *P. lycopersici*, l'autre par *C. coccodes* est courante. Cependant, nous pensons comme DAVET (1970) que chaque champignon évolue de façon indépendante.

Etant donné qu'actuellement, comme pour *P. lycopersici*, il n'existe que très peu de renseignements concernant le mode de pénétration et d'invasion de *C. coccodes*, il nous paraît opportun d'apporter notre contribution à l'étude des réactions produites par ce parasite au niveau des tissus racinaires de Tomate et de comparer ces résultats avec ceux obtenus pour l'agent de la maladie liégeuse. Dans ce but, avec l'aide des microscopes photonique et électronique (M.E.T. et M.E.B.), nous étudierons d'abord la structure des différents organes de l'agent pathogène (hyphe, sclérote, acervule, appressorium), puis celle des cellules hôtes parasitées par ce dernier, et plus particulièrement l'interface hôte/parasite ainsi que les modifications cytochimiques caractéristiques de ces zones.

I - MORPHOLOGIE DU CHAMPIGNON -

La morphologie de *C. coccodes* est bien connue depuis les travaux de DICKSON (1926) et SCHMIEDE-KNECHT (1957). Ces auteurs ont remarqué, cependant, une certaine variabilité dans les différents caractères, tant des organes végétatifs que des conidies.

La souche D₃ de *C. coccodes* utilisée dans notre étude, a été isolée, à partir de racines de Tomate suivant les techniques décrites en première partie. Sur milieu gélosé (Malt ou P.D.A.), le champignon forme des colonies circulaires, gris blanc à rose, prenant parfois une coloration améthyste.

Le mycélium est rarement aérien sauf dans certains secteurs, les sclérotés (dont le diamètre moyen est compris entre 200 et 300µm) sont nombreux et forment souvent une croûte d'aspect continu de couleur sombre.

Sur milieu P.D.A., on n'observe que peu d'acervules, par contre la formation de spores directement à partir du mycélium ("freie konidienbildung" SCHMIEDEKNECHT, 1957) est importante. Cependant, cette souche repiquée sur tranche de Pomme de terre non stérile développe uniquement des acervules et la production de conidies est importante. La taille des acervules est nettement plus faible que celle des sclérotés.

A - Le mycélium :

Le mycélium de *C. coccodes* est peu caractéristique et aussi bien en culture (sur milieu solide ou liquide) qu'à l'intérieur de l'hôte, on peut le confondre avec celui de *P. lycopersici*.

D'après SCHMIEDEKNECHT (1957), les articles des extrémités hyphales peuvent contenir de trois à six noyaux alors que les articles les plus âgés n'en présentent qu'un ou deux au maximum. Nous n'avons en ce qui nous concerne, pas observé plus de deux noyaux par loge et ceci très rarement.

Nous y notons la présence de mitochondries typiques, d'un réticulum endoplasmique de type agranulaire, de ribosomes ; nous n'avons pas observé de dictyosomes ou de structures apparentées. La vacuolisation apparaît plus ou moins importante selon l'âge du mycélium et nous remarquons de nombreuses inclusions lipidiques et du glycogène.

Les communications entre les divers articles s'effectuent à travers les cloisons à pore central, typiques des Ascomycètes (fig. 1, pl. XVII).

La paroi est composée de deux couches A et B semblables à celles des hyphes de *P. lycopersici*. Nous remarquerons cependant que (fig. 1, pl. XVII) la couche A délimite une épaisse couche mucilagineuse, ceci dans le cas d'une hyphe intramatricielle provenant d'une culture sur milieu gélosé.

Cette zone de mucilage est considérée comme une production externe de la cellule fongique ; elle peut être importante comme REISINGER (1972) l'observe chez *Stachybotrys cylindraspora*. D'après ce même auteur, la couche A représenterait en réalité des substances mucilagineuses déshydratées. Aussi dans les milieux fortement humides, elle apparaît tardivement ou ne se forme même pas et elle pourrait être remplacée par la zone de mucilage que nous rencontrons ici. Les hyphes intracellulaires présentent également ces deux couches, pourtant la zone apicale des hyphes infectantes ne possède pas de couche A (fig. 1, pl. XX).

Bien que les parties plus âgées en présentent, on ne peut expliquer la formation de cette couche A comme dans le cas précédent par déshydratation d'un exsudat mucilagineux. Cette pellicule externe résulterait selon nous d'une interaction hôte/parasite.

B - Les sclérotés :

Les sclérotés diffèrent des acervules au stade adulte par le fait que les premiers sont dépourvus de soies stériles. SCHMIEDEKNECHT (1957) décrit les sclérotés de *C. coccodes* comme formés par la coalescence d'hyphes à parois épaissies et anastomosées. Les hyphes externes forment un cortex pseudo-parenchymateux, les hyphes internes une médulle prosenchymateuse. Les hyphes des jeunes sclérotés, initialement hyalines et remplies de sécrétions lipidiques, s'assombrissent avec l'âge.

La taille des sclérotés varie de 100 à 3000µm, reflétant probablement des différences d'isolats et de conditions de culture. PLAKEMAN et HOPNBY (1966) décrivent des sclérotés de 130-350µm en moyenne sur les milieux de culture usuels. Nous avons pu observer les sclérotés formés en culture ainsi que sur des racines inoculées par une suspension de conidies. Ceux-ci apparaissent environ 12 à 15 jours après l'inoculation de racines de plantules (âgées de 8 jours) et émergent à travers l'épiderme (fig. 2, pl. XIII). D'après GRIFFITHS et CAMPBELL (1972), le développement des sclérotés de *C. coccodes* apparaît comme étant du type "strand", c'est-à-dire avec des filaments adjacents, entrecroisés et

ramifiés fusionnant pour former une masse compacte. Ce type de développement s'oppose au type "loose" caractéristique des sclérotos de *Rhizoctonia solani*, où la structure est plus lâche.

Comme nous pouvons le voir (fig. 2, pl. XVII), les hyphes constituant l'enveloppe externe du sclérote sont accolées les unes aux autres et ne sont séparées dans certains cas que par une zone mucilagineuse (zm), dans laquelle on observe la formation de granules probablement de nature mélanique. La présence de ces corpuscules de mélanine a une signification écologique certaine. En incrustant la charpente fondamentale des cellules fongiques, ils confèrent à celle-ci une résistance élevée vis-à-vis de la biodégradation (cf. WEPLEY et coll. 1971); REISINGER et KILBERTUS, 1973).

Quant à la structure du protoplasme des cellules fongiques constituant le sclérote (cortex et médulle), elle diffère sensiblement selon qu'on les observe sur un milieu de culture ou dans les tissus de l'hôte (fig. 2, 4 et 5, pl. XVII et fig. 5, pl. XIII).

En milieu de culture gélosé, les loges apparaissent plus importantes, ainsi que l'épaisseur de la couche B des parois.

Les inclusions lipidiques remplissent entièrement les articles constituant le cortex et la médulle et elles correspondent aux substances de réserve les plus importantes en volume. En microscopie photonique on les met facilement en évidence par la coloration au SOUDAN III. Outre ces globules lipidiques qui sont beaucoup moins nombreux et plus petits dans les sclérotos situés dans les tissus hôte, la présence de glycogène (G) est confirmée par la technique de THIERY (fig. 4, pl. XVII).

En effet, le glycogène constitue la réserve polysaccharidique la plus importante de la cellule fongique (ZALOKAR, 1965). Les organites cytoplasmiques tels que noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, .. sont repoussés, dans le cas de sclérotos provenant de culture sur milieu gélosé, contre les parois. Au contraire, dans les tissus de l'hôte, les hyphes constituant le sclérote montrent un cytoplasme moins riche en inclusions lipidiques et plus dense en organites, ce qui pourrait correspondre à un stade juvénile dans le développement du sclérote (fig. 5, pl. XIII).

Les sclérotés de *C. coccodes* étudiés ne possèdent pas d'enveloppe délimitant la masse sclérotiale. L'épaisseur des parois des cellules constituant le sclérote est identique de la périphérie jusqu'au centre et ces cellules dont les parois sont incrustées de particules mélaniques sont assemblées entre elles par une matrice mucilagineuse et fibrillaire. Il n'apparaît pas de gradation dans le degré de mélanisation du centre vers l'extérieur, comme celle que l'on a pu observer dans les pycnides de *P. lycopersici*. L'apparition fréquente de soies indique que ces sclérotés se transforment en acervules. Sur les racines de plants adultes, on observe à la fois les deux types d'organes; ceux-ci sont visibles à l'oeil nu et apparaissent généralement à la base des racines (fig. 1, pl. XIII).

Ils se forment le plus souvent dans les tissus corticaux qui pourrissent rapidement; le cylindre central est ainsi mis à nu. A la surface de ce dernier, il peut également se développer des sclérotés.

C - Les acervules -

On a très peu de renseignements sur la différenciation des sclérotés en acervules, bien que SCHMIEDEKNECHT (1956) signale le phénomène.

DICKSON (1926) ne distinguait pas les sclérotés des acervules. Ces derniers dérivent directement des cellules sclérotiales et consistent initialement en une couche de cellules de type palissadique qui se différencient plus tard en conidiophores et en soies.

Précédant la formation de spores, les cellules de l'acervule sont enveloppées d'une masse abondante de mucilage qui limite l'observation de la conidiogénèse. La présence des conidies est indiquée par leur extrusion à travers le mucilage (fig. 2 et 4, pl. XIV).

Comme le remarquent GRIFFITHS et CAMPBELL (1973), une certaine concomitance existe entre la formation de conidies et l'apparition de soies à l'intérieur de l'acervule.

Les soies consistent en longs filaments de cellules hyphales recouvertes extérieurement d'un dépôt de matériel mélanisé.

Les jeunes soies possèdent un aspect extérieur annelé (fig. 3 et 4, pl. XV), dû peut-être à des dépôts successifs comme le suggèrent GRIFFITHS et CAMPBELL (1973) ; cependant, les soies arrivées à maturité apparaissent lisses et toute annelation semble absente (fig. 1 et 5, pl. XIV).

Ce caractère d'ornementation des soies juvéniles pourrait, s'il est constant, avoir dans un cadre plus large, une importance taxinomique. En effet, HAWKSWORTH et WELLS (1973) considérant l'ornementation des soies stériles de *Chaetomium* et n'observant pas de relation étroite entre cette ornementation et d'autres caractères, concluent que celle-ci est un caractère indépendant et ainsi est d'un apport considérable à la taxinomie du genre.

Quant aux conidies qui apparaissent à travers la matrice mucilagineuse, elles sont cylindriques, obtuses ou en forme de cônes émoussés, parfois effilées à la base (DICKSON, 1925).

Selon SCHMIEDEKNECHT (1957), les conidies sont d'abord uninucléées et présentent ensuite une cloison transversale et des vacuoles importantes lorsqu'elles sont âgées.

Elles sont produites au sommet de conidiophores simples ou ramifiés, cylindriques, à extrémité arrondie et possédant de 0 à 3 cloisons (fig. 3, pl. XIV). Leur taille varie de 10 à 30 μ m d'après DICKSON (1925). Les conidies produites par des phialides sont solitaires et successives, non en chaînes (Von ARX, 1957).

Cependant, GRIFFITHS et CAMPBELL (1973), dans une étude récente en M.F.T., observent que la paroi interne de la phialide serait impliquée dans la formation de l'enveloppe conidienne, or d'après la terminologie de KANANASKIS (In : ELLIS, 1971), la phialoconidio-genèse est caractérisée par l'élaboration de propagules de nature entéroblastique.

La paroi sporale se forme *de novo* et ne montre ainsi aucune continuité avec une enveloppe préexistante.

Il existe cependant un certain nombre de phialides qui produiraient des conidies dont la paroi primaire est issue de la prolifération de la couche interne de la cellule mère (cf. ROQUEBERT et ABADIE, 1973).

Sur l'hôte, les acervules émergent en déchirant l'épiderme racinaire et souvent on n'observe à la surface de l'hôte que les soies stériles (fig. 1, pl. XIV).

En culture pure, on peut signaler la formation de conidies libres, directement à partir du mycélium (SCHMIEDEKNECHT, 1957).

D - Les appressoria :

Lorsque l'on place des conidies de *C. coccodes* en suspension dans l'eau, à l'étuve à 24-28°C, après quelques heures, on peut observer la formation de tubes germinatifs.

Au contact d'une surface solide (verre, hôte) se forment des organes de fixation, appelés "appressoria" par FRANCK (1883).

Von ARX (1957) considère ces organes comme caractéristiques du genre *Colletotrichum*.

Ils sont plus ou moins circulaires, à contour souvent festonné, fréquemment en forme de coeur, de diamètre variable (12 à 14µm) et de couleur sombre.

Pour certains auteurs, les appressoria sont des "spores secondaires" capables d'une certaine résistance (SOUTHWORTH, 1891 ; HALSTED 1892, cités par FORLOT, 1965), pour d'autres il s'agit de véritables chlamydospores (CLINTON, 1920 ; ETTIG, 1958 cités par FORLOT, loc. cit.).

Cependant, SCHMIEDEKNECHT (1959) met en évidence la possibilité pour *C. coccodes* de former

en culture mixte avec *Bacillus subtilis* des chlamydospores typiques 5 à 6 fois supérieures en taille aux appressoria. Il en déduit que ces derniers ne sont pas des chlamydospores. Toutefois, FORLOT (loc. cit.) testant la viabilité de ces organes dans le sol, conclut que si les appressoria ne sont pas des chlamydospores, ils présentent une certaine résistance et des caractères de spores durables.

Outre cette fonction de conservation, l'appressorium fortement appliqué à la surface des cellules hôtes émet une hyphe de perforation à travers la paroi des cellules épidermiques au moment de l'infection.

L'observation de la germination de notre souche D₃, montre que les conidies qui germent ne produisent pas toutes un appressorium. Cette germination peut être uni ou bipolaire et à un même pôle, on peut avoir production à la fois d'un tube germinatif normal et d'un appressorium (fig. 4, pl. XVI). Le tube germinatif émis peut être plus ou moins ramifié (fig. 6, pl. XVI).

La germination des conidies est rapide : quelques heures à température ambiante, par exemple avec notre souche en 10 à 12 heures à 20-22°C, 80% des conidies ont germé et nous avons environ 50 à 60% d'appressoria. La germination a lieu ici dans l'eau distillée disposée sur une lame de verre, le tout étant en chambre humide.

Les appressoria observés sont pour la plupart ronds et lisses (fig. 3 et 6, pl. XVI); au M.F.B. la surface des appressoria est granuleuse (fig. 1, 2, 4 et 5, pl. XVI) tandis que celle de la conidie est lisse.

En microscopie photonique (fig. 3 et 6, pl. XVI), les appressoria sont pigmentés en brun foncé et cette coloration apparaît 5 à 6 heures après la germination. Chez *Colletotrichum lagenarium*, comme d'ailleurs chez *C. coccodes*, cette pigmentation ne se produit pas sur les tubes germinatifs et peut être attribuée à l'accumulation de granules denses de type mélanique.

La germination bipolaire des conidies paraît contraire au fait qu'elles soient unicellulaires.

Cependant, nous avons remarqué comme BLAKEMAN et coll. (1966) la formation d'une cloison juste avant la germination. Cette cloison nettement visible sur certaines conidies (fig. 1, pl. XVI) existe même chez des conidies non germées, mais sans doute âgées (fig. 2, pl. XIV).

L'élaboration des appressoria de *C. coccodes* serait selon GRIFFITHS et CAMPRELL (1973) en partie sous la dominance de la température. D'après ceux-ci, une augmentation de la température au-dessus de l'optimum, qui est de 15°C pour la formation des appressoria, ne permet plus l'obtention de ces structures et ils observent la formation de conidies bi-cellulaires, à germination bipolaire ou simplement unipolaire.

En ce qui nous concerne, nous n'observons pas de phénomène semblable et en incubant à température ambiante du laboratoire (20-22°C), nous notons l'existence de tous les types de germination, avec une certaine prédominance pour la formation d'appressoria.

II - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INTERACTION HOTE/PARASITE-

A - Mécanisme de la pénétration des cellules corticales :

En microscopie photonique, l'examen de racines de Tomate infectées par une suspension de conidies de *C. coccodes*, en culture sur milieu de Hoagland gélosé ou sur terre stérile, montre que les cellules corticales réagissent au contact du parasite en formant des protubérances comparables à celles existant dans le cas de *P. lycopersici*. Ces protubérances sont en tout point semblables aux lignitubers décrits par SCHMIEDEKNECHT (1956) dans l'interaction

C. coccodes / *Solanum tuberosum*. Dans les racines entièrement envahies par le champignon, l'agglomération d'hyphes dans certaines cellules donne naissance à des sclérotés ou acervules apparaissant, dans le cas de plantules, 12 à 15 jours après l'inoculation (fig. 2, pl. XIII). Il est à noter que l'examen macroscopique des racines un ou deux jours après l'inoculation ne révèle aucun brunissement des tissus et seul un examen microscopique prouve la présence d'hyphes dans les tissus.

En M.E.T., l'examen des tissus envahis par *C. coccodes* montre des réactions semblables à celles observées pour *P. lycopersici*. Deux cas seront pris en considération :

- l'envahisseur (*C. coccodes*) rencontre une cellule hôte vivante.
- ou il rencontre des cellules hôtes moribondes.

1) Cas de cellules-hôtes moribondes :

Dans cette hypothèse, le passage de cellule à cellule s'effectue sans réaction apparente de l'hôte, par dissolution de la paroi au point de pénétration.

A cet endroit, on remarque une constriction de l'hyphe (fig. 3, pl. XX). La destruction du contenu des cellules en avant des hyphes est un phénomène assez général chez les parasites facultatifs, incapables de pénétrer des cellules vivantes (CALONGE, 1969).

Cette altération du cytoplasme des cellules de l'hôte résulte de la sécrétion de substances toxiques très diffusibles, émises par le champignon.

Notons encore que le champignon peut se propager dans les méats et entre les cellules en dégradant ou en séparant la paroi au niveau de la lamelle mitoyenne.

2) Cas où le champignon rencontre des cellules vivantes :

Lorsque des hyphes de *C. coccodes* rencontrent des cellules hôtes vivantes, des réactions caractéristiques de défense du végétal apparaissent.

Déjà, bien avant le contact de l'hyphes avec la paroi cellulaire, l'hôte réagit en élaborant des dépôts pariétaux (fig. 1, 3 et 4, pl. XXI) produits par le protoplasme des cellules vivantes.

L'approche de l'apex de l'hyphes provoque au niveau du point de pénétration, une déformation du dépôt pariétal qui prend la forme d'une papille identique à celle que l'on observe dans le cas d'infection par *Erysiphe graminis* (Mc KEEN et coll., 1973 - BRACKER, 1968). La forme de cette papille semble être due en partie à une action mécanique, en l'occurrence la pression exercée par l'hyphes infectante tendant à pénétrer dans la cellule et d'autre part à l'accumulation par dépôts successifs de substances amorphes en ce point.

Le franchissement de ces dépôts pariétaux, que nous dénommerons par analogie avec nos travaux précédents : lignitubers, ne se produit que dans les cellules où le protoplasme est fortement altéré. Cette altération est réalisée lorsque le plasmalemma et le tonoplaste sont rompus.

Ce franchissement suppose une action mécanique et chimique ; la destruction de la structure du lignituber confirme une forte activité lytique du champignon. La paroi de l'hôte ne semble que très peu affectée. La cellule contenant le parasite renferme de nombreuses substances denses aux électrons et en particulier, on remarque qu'une couche dense est souvent présente entre la paroi de l'hôte et du parasite (fig. 1, pl. XX). Cette matrice amorphe est peut-être une sécrétion d'origine fongique ou de l'hôte et peut aider à l'adhésion de la cellule fongique sur la cellule hôte. De telles matrices existent chez de nombreux pathogènes formant des haustoria (BERLIN et BOWEN, 1964 ; COFFEY et coll., 1972 ; OLAH et coll., 1971).

Lorsque ces dépôts sont constitués en majeure partie de callose, très peu perméable aux petites molécules (HESLOP-HARRISON, 1960 - in : BRACKER et LITTLEFIELD loc. cit.), de telles structures peuvent empêcher les mouvements de substances entre l'hôte et le pathogène (HARDWICK et coll., 1971) et servir de barrière efficace, altérant la nutrition du parasite.

B - Variations pathologiques dans l'ultrastructure des cellules corticales de l'hôte au cours de l'infection :

1) La paroi :

Le rôle de la paroi cellulaire dans les interactions hôtes/parasites a été décrit en détail par ALBERSHEIM et coll. (1969). Leur hypothèse est que la paroi de l'hôte détermine la possibilité pour le pathogène de produire les enzymes capables de dégrader cette même paroi.

La production de ces enzymes est responsable du succès ou de l'échec d'une infection par le parasite.

L'interface paroi de l'hôte/paroi fongique est de nature éminemment dynamique et variable: la composition chimique de la paroi végétale varie normalement au cours de la croissance et de la différenciation cellulaire. Ces variations sont encore plus importantes sous l'action du parasite.

La composition de la paroi de l'hôte diffère de celle de l'organisme pathogène, si l'on en juge par la différence de coloration à la suite du traitement par la technique de THIERY (fig. 2, pl. XXII).

Dans le cas où un lignituber a été élaboré contre la paroi, nous n'observons pas de dégradation importante de la structure pariétale de l'hôte, visible par le seul examen anatomique. Cependant, on peut supposer un relâchement des microfibrilles sous l'action des enzymes fongiques, probablement ; peptidases

et protéases, qui affectent les liens existant à l'intérieur du complexe protéines-polysaccharides constituant la paroi. Ces changements opérés dans l'arrangement des microfibrilles facilitent la dégradation de la cellulose.

Bien avant que la perforation de la paroi de l'hôte intervienne, sa composition subit des changements dont la mise en évidence peut être effectuée par la technique de THIERY.

La formation d'une matrice composée de plusieurs couches "colorées négativement" sur la face interne de la paroi végétale, indique une modification de celle-ci à ce niveau (Fig. 1, pl. XVIII). Bien que l'on ne remarque pas ce type de réaction constamment au point d'infection, on peut penser qu'il s'agit d'une modification temporaire et qui ne subsiste pas dans les parois de cellules mortes. Cette "inversion de coloration" peut être comparée à celle que l'on observe au niveau des grana de chloroplastes de feuilles de céréales infectées par *Helminthosporium maydis*. WHITE (1973) suppose que ces images correspondant à une réponse de l'hôte, impliquent des changements de propriétés chimiques. L'apparence de "coloration négative" indiquerait que les composants habituellement "colorés" (protéines, lipides) sont, soit absents, soit altérés de telle manière qu'ils sont incapables de réagir aux colorants employés normalement. De tels changements dans la structure de la paroi sont difficiles à interpréter et montrent à quel point l'interaction hôte/parasite est complexe et avec quelle prudence il faut commenter les images obtenues.

2) Le cytoplasme :

a) le plasmalemme :

La conservation de l'intégrité de cette membrane délimitant le cytoplasme est essentielle pour la cellule hôte. Comme nous l'avons vu précédemment, la rupture de la membrane cytoplasmique marque le début de la dégénérescence de la cellule et l'invasion par le parasite.

Dans une cellule saine, elle est en général accolée à la paroi. Mais quand le mycélium prend contact avec la paroi cellulaire, le plasmalemme (mc) devient très convoluté et se détache plus ou moins de la paroi (fig. 1, pl. XX et fig. 1, pl. XXI). Le plasmalemme est quelquefois séparé de la paroi de l'hôte par un dépôt pariétal et il est souvent bordé de corps pariétaux (Lo) (fig. 1, 2 et 4, pl. XXII). La présence de ces formations de type lomasomique paraît être en relation directe avec la présence du parasite et le dépôt de substances amorphes entre la paroi et le plasmalemme comme le proposent PEYTON et BOWEN (1963).

Lorsque la cellule corticale est sévèrement endommagée par le parasite, son plasmalemme dégénère et il n'est plus distinguable des autres membranes cytoplasmiques (fig. 1, pl. XX).

b) les organites cyto-
plasmiques :

Parmi les organites cellulaires, les mitochondries réagissent très tôt à l'infection. Bien en avant des hyphes, on constate déjà un accroissement de leur nombre, une diminution de leur taille et l'agglomération préférentielle dans certains endroits de la cellule. Cette migration privilégiée vers une région cytoplasmique donnée, peut traduire une activité métabolique intense à cet endroit, et en particulier, une synthèse protéique.

On note également une certaine concentration des mitochondries dans la région cytoplasmique adjacente aux dépôts pariétaux et lionitubers (fig. 2, pl. XVIII) où se déroulent les échanges entre l'hôte et le parasite. Cet état du chondriome traduit dans les premiers stades de l'infection une modification de la physiologie de l'hôte et des synthèses diverses.

Dans un stade plus avancé de l'infection, les mitochondries manifestent quelques signes de dégénérescence ; elles augmentent de volume, leurs crêtes deviennent plus ou moins gonflées puis finissent par disparaître.

Finalement, elles sont dépourvues de toute structure organisée et il ne reste plus que la membrane externe (fig. 4, pl. XVIII). Le chondriome constitue certainement l'un des éléments cytoplasmiques les plus résistants à l'invasion fongique. En effet, même après la rupture du plasmalemma et du tonoplaste, les mitochondries subsistent encore très longtemps (fig. 1, pl. XX).

Quant au réticulum endoplasmique (re), il apparaît sous deux aspects : lisse et rugueux.

Le type granulaire intervient comme le chondriome dans la synthèse protéique, alors que le réticulum lisse paraît être impliqué dans la formation des parois et la synthèse des lipides.

Le nombre et l'activité de ces organites présentent des aspects différents selon le stade de l'infection.

Bien qu'ils soient surtout concentrés dans les endroits où le parasite est en contact avec la cellule hôte (fig. 2, pl. XVIII), on les observe également en très grand nombre et disposés en empilements dans les zones non parasitées mais où l'on observe la formation de dépôts pariétaux (fig. 1, pl. XIX). Le type le plus fréquemment rencontré est le réticulum endoplasmique granulaire, tapissé de grains de Palade. Le réticulum est disposé en général parallèlement au plasmalemma, dans le cas de dépôts pariétaux, réalisant ainsi une association intime entre les deux systèmes membranaires. Cette association revêt une certaine importance surtout quand on connaît la fonction assumée par ces organites dans le transport de diverses substances provenant de l'hôte ou du parasite.

L'appareil de Golgi (Go) des cellules de l'hôte est constitué par un empilement de saccules renflés à leurs extrémités, au niveau desquels des vésicules sont émises.

L'observation de vésicules est fréquente dans le cytoplasme de cellules en contact avec le parasite et où l'on remarque l'élaboration d'un dépôt pariétal.

Elles semblent donc témoigner d'une activité sécrétoire intense ; le nombre de vésicules peu important dans les cellules saines, s'accroît rapidement au fur et à mesure de la progression du parasite (fig. 2, pl. XVIII).

Toutefois, dès la rupture du plasmalemma, on ne note plus la présence de dictyosomes, seules quelques vésicules subsistent et correspondent peut-être à des formes de dégénérescence de ces organites.

Les dictyosomes ont un rôle très important dans le maintien de l'intégrité du contenu cellulaire, ainsi que dans l'édification de la paroi. Ils synthétisent des substances de nature polysaccharidique précurseurs de la paroi, dont le transport est assuré par les vésicules (BRACKER et LITTLEFIELD, 1973).

La disparition des dictyosomes, lors de la pénétration du parasite, pourrait constituer une des raisons pour lesquelles le champignon continue sa progression dans les tissus de l'hôte. Car, lorsque les cellules sont infectées, l'équilibre existant entre la fonction de construction et la fonction autolytique des corps de Golgi peut être rompu. La cellule en contact avec le parasite, incapable alors de répondre, dégénère et se laisse envahir par les hyphes du pathogène.

Quant aux plastides rencontrés dans les cellules corticales, nous pouvons faire la même remarque que dans l'invasion par *P. lycopersici*.

L'absence d'amyloplaste y est très caractéristique.

Les ribosomes sont toujours présents dans le cytoplasme sous forme libre ; dans le cas de l'élaboration de dépôts pariétaux, on constate leur arrangement en polyribosomes (fig. 3, pl. XXI) caractéristique de la grande activité sécrétrice de cet endroit.

Le noyau des cellules en voie de pénétration, comme dans le cas d'une attaque par *P. lycopersici*, migre vers le lignituber ou la zone de

contact avec l'hyphe infectante. Ce phénomène est rapporté comme étant assez constant chez les parasites formant des suçoirs (COFFEY et coll., 1972) ; OLAH et coll., 1971), bien que certains ne l'observent pas toujours (LITTLEFIELD et coll., 1972). D'après ces auteurs, l'enveloppe nucléaire de l'hôte pourrait bien posséder une importance fonctionnelle dans la région interfaciale.

De tous les organites de la cellule infectée, le noyau conserve son intégrité très longtemps et sa destruction complète n'intervient qu'après l'envahissement total de la cellule. Sa dégénérescence est marquée par des variations de l'aspect du caryoplasme et de la membrane nucléaire, similaires à celles décrites dans les cellules envahies par *P. lycopersici* (DELON et coll., 1973).

- Les "microbodies" :

L'apparition de "microbodies" avec une région centrale d'aspect cristallin, semblable à ceux observés dans les cellules de tissus racinaires parasités par *P. lycopersici*, absents dans les cellules de racines saines, semble bien prouver que ces organites interviennent réellement dans les réactions de l'organisme ou au cours du processus infectieux. Les "microbodies" se trouvent en grand nombre dans les cellules non encore parasitées mais réagissant déjà au pathogène situé dans les cellules adjacentes.

3) Les vacuoles :

Le centre des cellules est occupé par une grosse vacuole (V) limitée par une membrane simple.

Elle peut accumuler des substances de réserve et des déchets divers et nous y observons aussi la présence de "corps étoilés" déjà décrits dans le chapitre précédent.

Dès le début de l'infection, la vacuole centrale dont le contenu apparaît peu dense aux électrons se fragmente et donne naissance à de nombreuses vacuoles de petite taille (fig. 1, pl. XIX et fig. 3, pl. XXI).

Le tonoplaste conserve son intégrité assez longtemps dans les cellules présentant des lignitubers, cependant c'est lui ainsi que le plasmalemme

qui marquent le début de la désorganisation cellulaire en se rompant.

4) L'appareil conducteur :

Le système vasculaire n'a pas retenu particulièrement notre attention; nous remarquerons cependant que *C. coccodes* comme *P. lycopersici* atteint fréquemment le xylème des plantules où il provoque la formation de tyloses.

5) Les substances denses aux électrons :

La présence de substances denses aux électrons à l'intérieur des cellules constitue l'une des dernières étapes de l'infection parasitaire. Les hyphes du parasite envahissent les cellules et cette pénétration s'accompagne de la production de formations denses déjà observées dans l'interaction *L. esculentum*/*P. lycopersici* et classées schématiquement en trois catégories. Nous retrouvons avec *C. coccodes*, ces mêmes particules (fig. 1 et 2, pl. XX et fig. 4, pl. XXII) bien que les particules P_3 apparaissent peu fréquentes. On pourrait rapprocher ce fait de l'absence de brunissement des tissus envahis par *C. coccodes*, au contraire les tissus racinaires de Tomate brunissaient fortement au contact d'une souche de *P. lycopersici* et dans les cellules parasitées, on remarquait la présence de nombreuses particules P_3 .

La signification de ces substances denses dans le parasitisme n'est pas encore élucidée. On peut remarquer néanmoins qu'elles sont liées à la présence du parasite à l'intérieur de la cellule hôte et à la proximité de cellules vivantes.

En conclusion, si en partie ces substances proviennent de l'altération du cytoplasme de l'hôte, elles peuvent également être produites "*de novo*" par le parasite (particules de type mélanique) ou par les cellules encore vivantes de l'hôte (toxines...).

Dans le cas de toxines émises par l'hôte ou le champignon, elles précipiteraient sous l'action de l'antagonisme ou formeraient des complexes quinoniques.

III - ETUDE CYTOCHIMIQUE -

A - Mise en évidence des substances polysaccharidiques :

Nous remarquons d'emblée que l'interaction plante hôte/parasite favorise la synthèse de substances de nature polysaccharidique, et principalement au niveau des dépôts pariétaux (fig. 2, 3 et 4, pl. XXII).

Le plasmalemme de la cellule hôte ainsi que les structures qui lui sont associées apparaissent fortement marqués par le protéinate d'argent.

Quant aux dictyosomes, suivant leur position par rapport à la paroi, leur activité sécrétrice apparaît plus ou moins marquée ; les dictyosomes situés à proximité de la paroi émettent des vésicules très contrastées, révélant ainsi la présence de polysaccharides (fig. 1, 2 et 3, pl. XXII).

Les corps de Golgi plus éloignés de la paroi, bien qu'actifs, et émettant de nombreuses vésicules, ne paraissent pas produire de polysaccharides. MOLLENHAUER et MORRE (1966) cités par ROUGIER et coll. (1973) ont déjà démontré l'importance de l'activité golgienne dans le transport de polysaccharides.

Suivant la différenciation cellulaire, les dictyosomes donnent naissance à des polysaccharides de nature différente : sécrétions mucilagineuses, précurseurs pariétaux, produits de réserve.

L'absence ou la faible intensité des réactions observées dans les vésicules produites par les dictyosomes éloignés de la paroi, peut s'expliquer par l'existence d'un gradient de différenciation. Ce phénomène a été signalé par ROLAND et SANDOZ (1969) qui observent une maturation progressive des produits élaborés au cours de leur transport sous la forme de vésicules de concentration.

Quant aux dépôts pariétaux et lignitubers, bien que l'ensemble nous apparaisse plus contrasté que la paroi, il est vraisemblable que la matrice elle-même n'est pas constituée essentiellement de polysaccharides. Mais comme on peut le voir sur certaines microphotographies (fig. 3 et 4, pl. XXII), il s'agit plutôt de l'incorporation dans une matrice de composition inconnue de particules de nature polysaccharidique.

Les organites cytoplasmiques autres que les dictyosomes et le système vacuolaire ne présentent pas de réaction fortement positive à l'acide périodique-TCH-protéinate d'argent.

Bien que CARASSO et coll. (1970) suggèrent la présence de polysaccharides dans le réticulum endoplasmique, en particulier lorsqu'il y a couplage avec des protéines chez les Protistes ciliés, nous n'observons pas dans les cellules parasitées de réaction semblable au niveau du réticulum.

B - Mise en évidence des protéines :

Nous ne discuterons pas ici de la spécificité biochimique de la technique de Gomori-Swift (1968) pour la mise en évidence des protéines contenant de la cystine.

Nous remarquerons surtout que dans les tissus infectés par *C. coccodes*, l'application des réactifs argent méthénamique-acide borique et borax dans les conditions définies par Swift (1968) révèle la présence d'une grande concentration de substances

protéiniques au niveau des parois pectocellulosiques où s'édifient des dépôts pariétaux (fig. 1 et 3, pl. XIX) et des lignitubers (fig. 2, pl. XIX).

Le cytoplasme des cellules hôtes parasitées ne décèle pas d'organites réagissant plus que d'autres au réactif de Gomori-Swift. On remarquera néanmoins que le noyau cristallin des microbodies (mo) observés dans certaines cellules et dont nous avons déjà discuté le rôle possible dans l'interaction hôte/parasite, apparaît très dense aux électrons.

On constate également que le nucléole des noyaux des cellules hôtes réagit intensément.

A la suite de l'examen des coupes traitées par la technique de Gomori-Swift, on se rend compte de la réactivité considérable de la paroi et des dépôts qui lui sont associés dans les cellules parasitées.

Il nous paraît digne d'intérêt de rapprocher ces résultats de ceux obtenus dans le cas de la relation parasitaire mettant en jeu *P. lycopersici* en ce qui concerne les activités enzymatiques..

En effet, il est très probable que l'augmentation du taux de protéines observée au niveau des parois correspond à la présence de protéines, constituants principaux des enzymes. Nous révélons ainsi la présence au niveau de l'interface hôte/parasite de profonds changements d'ordre biochimique qui ne sont pas visibles par une simple coloration par le citrate de plomb ou l'acétate d'uranyle.

L'hôte dans sa lutte contre le parasite établit donc une barrière physique en accumulant des substances de nature chimique diverse contre les parois, tendant ainsi à la renforcer. L'hôte organise également une barrière biochimique consistant en l'accumulation de substances toxiques ou d'enzymes hydrolysantes pouvant provoquer dans certains cas la mort du champignon et ainsi enrayer l'invasion parasitaire.

Toutefois, la présence de substances protéiques dans la paroi de l'hôte peut correspondre à une production du parasite qui tente lui aussi de détruire les cellules racinaires. Dans l'état actuel de nos connaissances, il nous est impossible de trancher et nous ne considérons les hypothèses exposées ci-dessus que comme des éléments permettant d'entreprendre une étude plus spécifique.

IV - ETUDE AU M.E.T. DES RACINES MORTES DE PLANTES ADULTES PRESENTANT DES SYMPTOMES DU "BLACK-DOT" :

De l'examen de racines de Tomate provenant de serre et présentant les symptômes de la maladie des "points noirs", nous remarquons :

- que du point de vue ultrastructural, il nous est difficile de différencier les tissus parasités par *C. coccodes* des tissus envahis par *P. lycopersici* ou même par d'autres parasites ou saprophytes ;

- nous observons cependant que les tissus racinaires présentant des sclérotés de *C. coccodes*, montrent des cellules à parois fortement épaissies par une couche très claire aux électrons (fig. 2 et 3, pl. XXIII). Même après traitement par les réactifs des protéines, cette zone reste claire et contraste fortement avec la paroi qui, elle, est dense aux électrons et qui reste pratiquement intacte ;

- l'absence ou la rareté d'hyphes vivantes et au contraire la présence d'une population bactérienne très active (fig. 2, 3 et 4, pl. XXIII).

De ces constatations, nous retiendrons que si la propagation de la maladie semble s'établir à partir des débris racinaires (FORLOT, 1965), le parasite ne paraît pouvoir se conserver dans le sol qu'à l'état de sclérotés dans les résidus de culture.

Les hyphes, ou ce qu'il en reste, ne paraissent pas pouvoir constituer des formes de conservation du parasite. Ainsi l'étude ultrastructurale concernant la conservation de *C. coccodes* dans les débris de racines dans le sol, pourrait constituer une étape importante dans nos connaissances concernant le devenir des sclérotas.

CONCLUSION -

Colletotrichum coccodes (Wallr) Hughes est reconnu comme étant l'agent pathogène responsable de la maladie des points noirs (= Black dots) des racines de Tomate.

Bien que son importance comme parasite soit reconnue par de nombreux auteurs (FORLOT, 1965 ; DAVET, 1970), il est souvent difficile de séparer ses dégâts de ceux provoqués par *P. lycopersici*.

Cette étude a donc eu pour but d'élucider les mécanismes d'infection des cellules corticales et leurs réactions vis-à-vis de *C. coccodes*.

L'interaction entre l'organisme fongique et l'hôte a provoqué une série de modifications du métabolisme des deux organismes, engendrant des conditions favorables à la pénétration intracellulaire du parasite.

La phase d'activation qui précède la pénétration, voit la formation de dépôts pariétaux, bien en avant des hyphes du parasite. Le contact des hyphes avec la paroi pecto-cellulosique de l'hôte provoque la formation de lionitubers, correspondant à une accumulation plus importante de matériel amorphe en ce point, ou tout simplement à une déformation du dépôt pariétal sous la pression exercée par l'hyphe infectante.

Corrélativement à l'élaboration de ce type de barrière physique, il semble, d'après les

résultats obtenus après l'application de la technique de Gomori-Swift, qu'il y ait également accumulation au niveau des parois, de substances de nature protéique. On peut supposer qu'il s'agit là de la synthèse d'enzymes ou substances protéiques par la plante ou par le parasite.

Dans sa défense contre l'invasion parasitaire, tous les organites cytoplasmiques de la cellule sont plus ou moins impliqués et la concentration de ceux-ci au niveau du point de pénétration confirme cette hypothèse.

Les étapes suivantes montrent la perforation de la paroi de l'hôte, avec à ce niveau un étranglement de l'hyphe. Après le franchissement de la paroi, l'hydrolyse du lignituber et la dégénérescence de la cellule s'accélèrent.

Cette altération du cytoplasme de l'hôte est marquée par une disparition progressive des éléments figurés (mitochondries, dictyosomes, plastes, etc...), les noyaux et mitochondries conservant leur aspect et sans doute leur activité le plus longtemps.

Puis l'apparition de substances denses aux électrons dans la lumière des cellules correspond comme pour *P. lycopersici*, à la mort de la cellule hôte et ainsi au succès de l'infection. A ce stade, la décomposition des organites est très avancée et ils ne sont plus identifiables.

CONCLUSION GENERALE

En dépit de l'aide apportée par la microscopie électronique pour l'élucidation des relations entre hôte et parasite, il n'existe que très peu de travaux concernant l'ultrastructure des mécanismes d'infection de racines par des parasites facultatifs.

Le travail présenté ici est une contribution à l'étude ultrastructurale de la pathogénie de deux champignons responsables de lésions importantes du système racinaire de la Tomate. Il a été conduit sur les complexes *Pyrenochaeta lycopersici* / *Lycopersicon esculentum* Var. Marmande, et *Colletotrichum coccodes* avec le même hôte.

Ces deux agents pathogènes causent des baisses de rendement appréciables aux cultures intensives de Tomate en serre. Néanmoins, l'importance relative de ces deux parasites est très discutée.

Les résultats obtenus à la suite de nos investigations montrent que l'hôte réagit de façon identique à l'infection de l'un des deux parasites.

L'approche d'une hyphe de *P. lycopersici* ou de *C. coccodes* des tissus de l'hôte, provoque chez ceux-ci des modifications s'exprimant au niveau de l'infrastructure par de profonds bouleversements et en particulier, par une augmentation du nombre d'organites cytoplasmiques.

Cette phase d'activation qui précède la pénétration simule un rajeunissement cellulaire.

La zone de confrontation entre la cellule hôte et les parasites constitue l'interface (BRACKER et LITTLEFIELD, 1973). Le type d'interface est déterminé en partie par le caractère de l'interaction. Pour certains parasites facultatifs qui tuent les cellules hôtes en avant des hyphes, l'interface hôte/pathogène s'étend sur une grande distance depuis la cellule fongique jusqu'à l'endroit où les substances élaborées par le champignon agissent sur les cellules vivantes de l'hôte.

Au contraire, chez les parasites formant des suçoirs intracellulaires, l'interface plus localisé, est peut-être d'une plus grande importance théorique. L'interaction y est plus directe, pour la simple raison de la proximité physique des deux protoplasmes vivants.

BRACKER et LITTLEFIELD (1973), dans une synthèse bibliographique récente, distinguent 40 types d'interfaces réparties en 6 groupes :

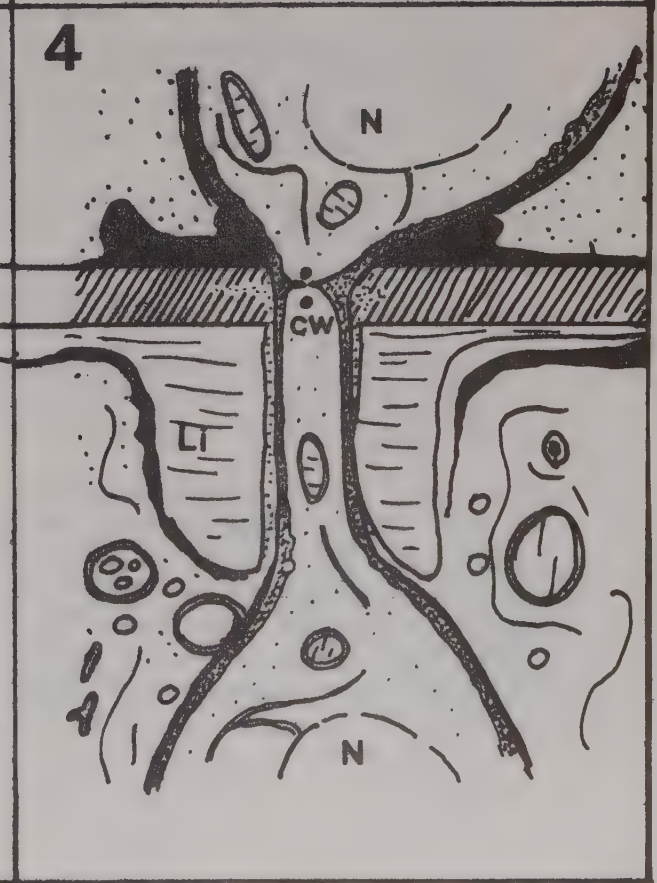
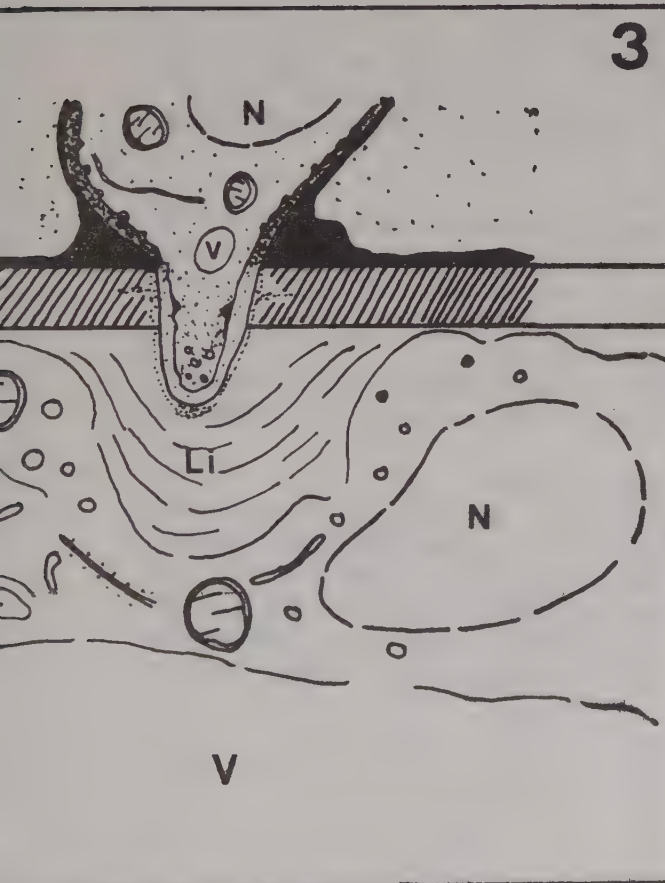
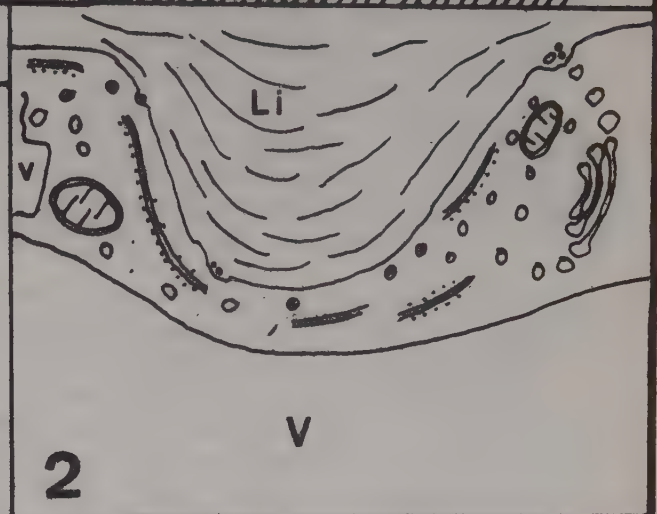
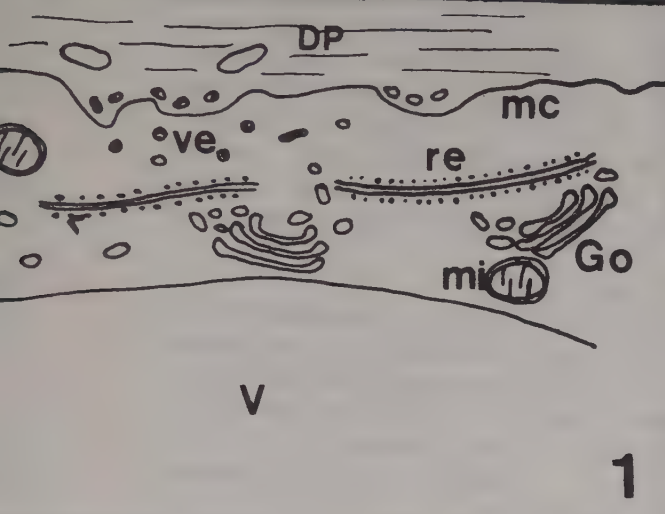
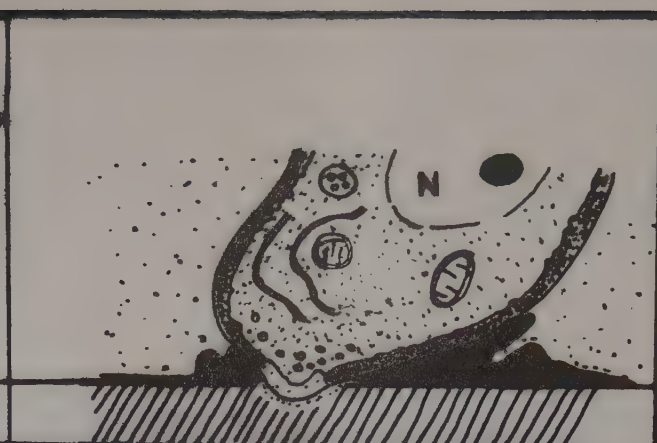
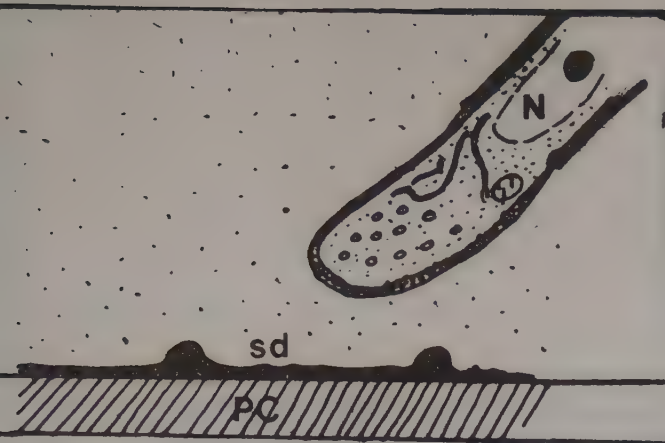
- 1er gr. : Interfaces ne faisant pas intervenir les parois cellulaires de l'hôte et du symbionte (ex : Plasmode de *Plasmodiophora brassicae* dans des cellules hôtes).
- 2ème gr. : Interface comprenant la paroi cellulaire de l'hôte et du symbionte (ex : site de pénétration des oïdiums).
- 3ème gr. : Interface comprenant la paroi cellulaire du symbionte mais non celle de l'hôte.
(ex : région du col des haustoria dans le cas d'infection par des Rouilles).
- 4ème gr. : Interface comprenant la paroi cellulaire de l'hôte mais non celle du symbionte.
(ex : zoospores situées à la surface de cellules hôtes avant la sécrétion de la paroi fongique).
- 5ème gr. : Interface comprenant la cuticule sur la paroi cellulaire de l'hôte.
(ex : hyphes de *Venturia inaequalis* sur des feuilles de Pommier).
- 6ème gr. : Interface concernant des symbiontes eucaryotiques mais ne faisant pas intervenir les composants cellulaires (ex : sporogénèse de *Plasmodiophora brassicae*).

En reprenant la terminologie de BRACKER et LITTLEFIELD (loc. cit.) et en examinant les figures représentant schématiquement le mécanisme d'infection des cellules corticales de racines de Tomate par *P. lycopersici* et *C. coccodes*, nous distinguons : la proximité du mycélium d'une cellule hôte provoque chez celle-ci (fig. 1 du schéma) des modifications s'exprimant par l'apparition de dépôts pariétaux (DP). Leur nature chimique demande à être précisée, bien que la réaction de THIERY, nettement positive, laisse supposer dans les premiers stades l'accumulation de substances polysaccharidiques. Nous remarquerons que *C. coccodes* semble agir à une distance plus importante que *P. lycopersici*.

La technique de GOMORI-SWIFT révèle une élévation de la concentration des protéines contenues dans les parois et les dépôts pariétaux. Ce fait est important à souligner car la paroi cellulaire de l'hôte sain ne comporte environ que 10% de protéines et apparaît peu dense aux électrons à la suite du traitement par les mêmes techniques.

Les variations observées peuvent être dues à l'accumulation de substances diverses (enzymes, toxines, etc...) émises par la plante-hôte ou le parasite lui-même.

A ce stade, on remarque que le cytoplasme est repoussé contre les parois par des vacuoles qui augmentent en taille et en nombre. Dans ce cytoplasme, on constate l'accumulation des organites au site de pénétration. Le nombre des mitochondries (mi) augmente, elles deviennent plus petites et possèdent de nombreuses crêtes. Le réticulum endoplasmique (re) long et flexueux, de type granulaire, se dispose parallèlement au plasmalemme. Les corps de Golgi (Go) nombreux émettent des vésicules. Les rares plastes que l'on peut dénombrer, sont dépourvus d'amidon, alors que dans les cellules corticales de racines non parasitées, les amyloplastes sont nombreux.



Le stade suivant (fig. 2 du schéma) est caractérisé par la formation, au site de pénétration, de lignitubers possédant une matrice amorphe, dont la composition chimique est complexe. L'élaboration de cette "papille" paraît être assurée par le protoplasme de la cellule-hôte. En effet, les lignitubers sont longtemps délimités extérieurement par le plasmalemme de la cellule hôte, au niveau duquel on constate fréquemment la présence de corps pariétaux (Lo) responsables selon certains auteurs de l'apport de constituants de la paroi.

De plus, de multiples vésicules (ve) et dictyosomes sont présents à proximité du point de pénétration, suggérant que ce dépôt pariétal est formé en partie par concentration de matériaux transportés par l'intermédiaire de ces vésicules. Ces dernières réagissant nettement aux réactifs : acide périodique - T.C.H. - protéinate d'argent, confirment donc cette hypothèse.

Cette étape montre également la dissolution de la paroi végétale au site de pénétration. Il est à souligner que la composition chimique du parasite apparaît elle aussi modifiée à ce niveau.

La technique de THIERY révèle une diminution de la concentration en polysaccharides de la paroi fongique en contact avec le lignituber ainsi que l'absence de sécrétion de couche A.

En outre, la présence de substances denses (sd) entre la paroi de l'hôte et la cellule fongique favoriserait l'adhérence de l'hyphe infectieuse..

Ces types d'interfaces sont à rapprocher de ceux décrits par BRACKER et LITTLEFIELD (loc. cit.) sous les références : IT 11, IT 12, IT 16, IT 17, (2 gr.) où l'on a un contact entre la paroi d'un symbionte vivant et la paroi de l'hôte vivant ou mort qui montre un dépôt pariétal et où la présence d'une matrice dense aux électrons entre les parois des deux organismes peut intervenir.

Lorsque la phase d'équilibre entre les deux protagonistes est rompue (fig. 3 du schéma), le protoplasme de la cellule-hôte s'altère profondément.

Les organites qui se sont concentrés au site de pénétration perdent peu à peu leur structure normale, le plasmalemme se rompt en de nombreux endroits ainsi que le tonoplaste. L'apparition de structures de type lamellaire correspond à une des phases ultimes de la désintégration des éléments cytoplasmiques. Les types d'interfaces observés au cours de la pénétration correspondent au groupe 3, dans lequel la paroi de l'hôte n'intervient plus. L'hyphe n'est séparée de l'hôte que par le dépôt pariétal. On a donc le type IT 21 ou IT 23 (voir tableau, page 68). Le champignon émerge enfin des lignitubers (fig. 4) et envahit la cellule, tout en se dirigeant vers la cellule suivante où il provoquera si elle est encore vivante, les mêmes réactions que précédemment. Les cellules dégénérées contiennent souvent des substances denses aux électrons, dont l'origine et le rôle ne sont pas connus, mais qui pourraient être impliquées directement dans l'interaction parasitaire par action toxique sur l'un des partenaires ou les deux. Ces substances peuvent même ne pas être toxiques. L'action des parasites se manifeste également par l'apparition dans le cytoplasme des cellules voisines des tissus parasités, de corps à centre cristallin morphologiquement semblables aux "microbodies". Ces derniers pourraient exprimer des modifications des activités enzymatiques.

L'augmentation des activités peroxydasi-ques et polyphénoloxidasiques au niveau des parois pecto-cellulosiques des tissus infectés, comme celle de la concentration en protéines des parois et dépôts pariétaux, est également caractéristique de l'invasion fongique.

Cependant, si l'importance de ces modifications d'ordre biochimique, dans le développement de la maladie est incontestable, leur rôle physiologique

est loin d'être élucidé.

A côté de cette propagation intracellulaire qui semble être la règle pour les deux champignons pathogènes des racines de jeunes plantules de Tomate, un cheminement intercellulaire peut être également observé.

Les types d'interfaces correspondants sont : IT 8 ou IT 9 selon que les cellules de l'hôte sont vivantes ou mortes (voir tableau page 68).

Le dernier type d'interface représente les hyphes vivantes des parasites dans les cellules mortes de l'hôte et appartient au groupe 3 : IT 26 ou IT 19 selon que les hyphes sont recouvertes ou non d'une sécrétion dense aux électrons (voir tableau page 68).

Voici donc sommairement résumés les principaux résultats obtenus au cours de l'étude concernant l'identité des composants de l'interface entre les cellules corticales de racines de Tomate et de deux parasites facultatifs : *P. lycopersici* et *C. coccodes*.

L'examen approfondi des composants interfaciaux revêt une certaine importance car toutes les structures situées entre deux protoplasmes vivants antagonistes peuvent avoir un rôle fonctionnel considérable dans l'interaction symbiotique.

De tels composants peuvent agir en tant que barrières physiques ou chimiques, être un site où les organites sont détruits ou tendre à stabiliser ou protéger l'hôte ou le symbionte. C'est ainsi que la comparaison entre les interfaces existant lors de la pénétration par des parasites obligatoires tels que les oïdiums et celle de parasites facultatifs (*P. lycopersici*, *C. coccodes*) ne permet pas de déceler de différences notables. Seule la rupture de l'équilibre entre symbionte et hôte est plus ou moins retardée. Les cellules végétales parasitées par des organismes biotrophes conservent plus longtemps leur intégrité que dans le cas d'organismes saprophytes.

TABLEAU

Principaux types d'interfaces observés dans l'interaction

L. esculentum avec *P. lycopersici* ou *C. coccodes*

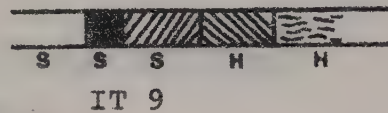
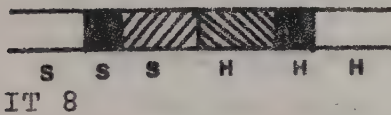
(D'après la nomenclature de BRACKER et
LITTLEFIELD, 1973)

INTERFACE COMPRENANT LA PAROI DE L'HÔTE ET DU SYMBIONTE

(2ème groupe)

- Pas de matrice entre les parois du symbionte et de l'hôte.

. Pas de dépôt pariétal :

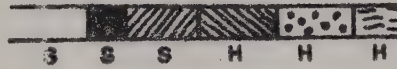


Cas des hyphes intercellulaires de *P. lycopersici*
ou *C. coccodes*.

(Fig. 2, pl. V)

(Fig. 5, pl. V)

. Présence de dépôt pariétal :



(Fig. 4, pl. XXII)

(Fig. 3, pl. V)

- Présence d'une matrice entre les parois du symbionte et de l'hôte :

. Présence de dépôt pariétal :



(Fig. 1, pl. I)

(Fig. 1, pl. V)

. INTERFACE COMPRENANT LA PAROI DU SYMBIONTE MAIS NON CELLE DE L'HÔTE (3ème groupe)

- Pas de matrice entre l'hôte et le symbionte.

. Pas de dépôt pariétal :

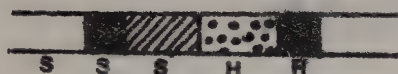


IT 19

Cellule fongique vivante dans une cellule hôte morte.

(Fig. 5, pl. V)

. Présence d'un dépôt pariétal :



IT 21



IT 23

Hyphe dégradant un lignituber.

(Fig. 1, pl. I

Fig. 1, pl. VI

Fig. 2, pl. XVIII)

(Fig. 3 et 4, pl. XVIII

Fig. 1 et 3, pl. V)

- Matrice entre l'hôte et le symbionte.

. Pas de dépôt pariétal :



IT 26

Cellule fongique enveloppée d'une matrice amorphe dans des cellules hôtes mortes.

(Fig. 1, pl. XX)

LEGENDE :

S Hôte



Cytoplasme



Cellule moribonde



Paroi



Dépôt pariétal

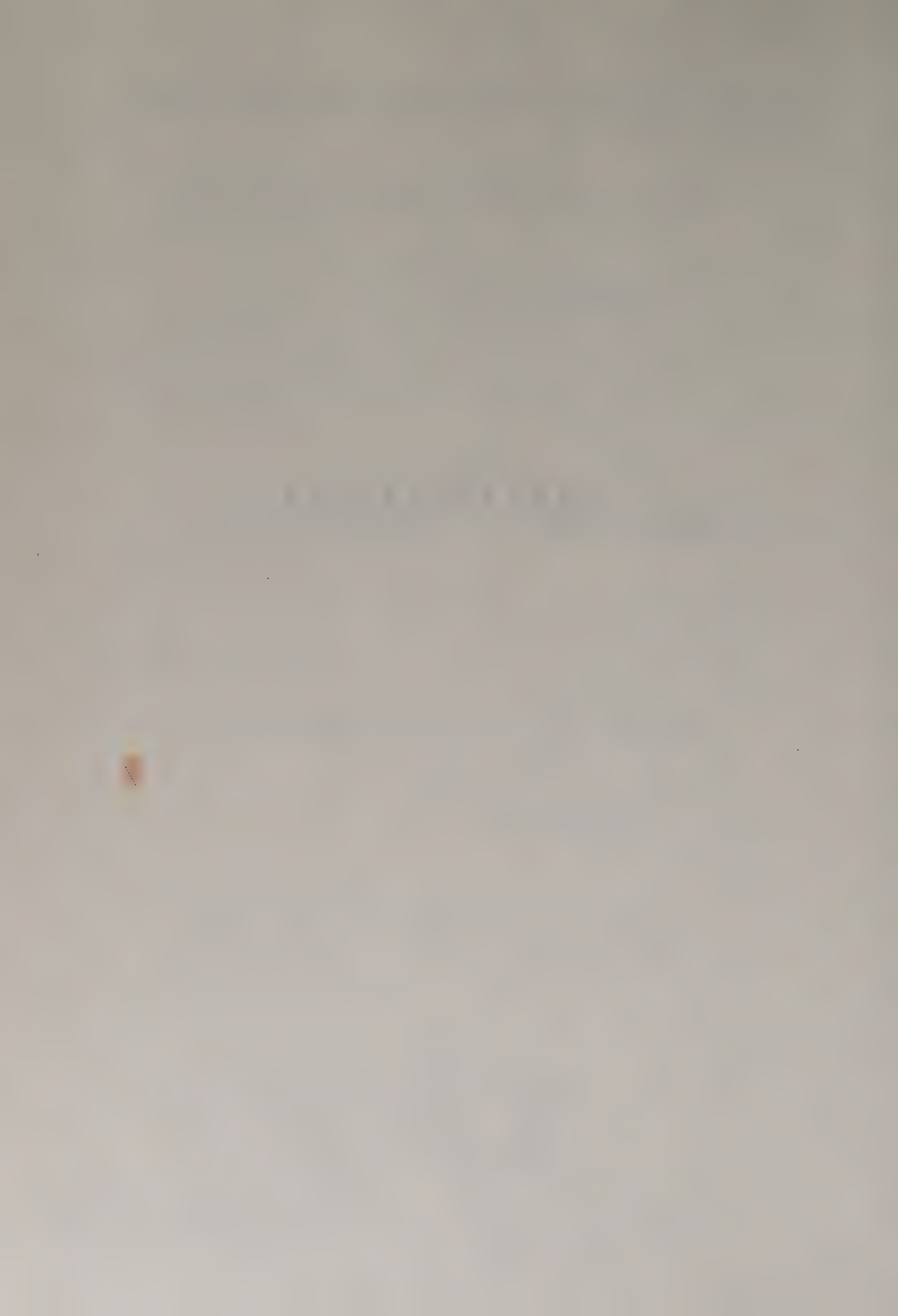


Matrice intra ou extra-cellulaire dérivant de l'hôte ou du symbionte ou des deux



Plasmalemma

B I B L I O G R A P H I E



- ALBERSHEIM P., JONES T.M., ENGLISH P.D. (1969). - Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes.
A. Rev. Phytopath., 7, pp. 171-194.
- ARX J.A. Von (1957). - Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda.
Phytopathol. Zeitschrift, 29, 4, pp. 413-468.
- PABA S. (1958). - Histochemical studies of wound periderm formation.IV. Changes in activity of phenol oxydases.
Mem. coll. Sci., Univ. Kyoto, B 25, pp. 63-68.
- BESRI M. (1970). - Recherches concernant l'écologie, la morphologie et la physiologie de l'agent du "Corky Root".
Thèse Docteur-Ingénieur, Faculté des Sciences, Université Nancy I.
- BERLIN J.D., BOWEN C.C. (1964). - The host-parasite interface of *Albugo candida* on *Raphanus sativus*.
Am. J. Bot., 51, pp. 445-452.
- BEWLEY W.F. (1916). - A new root disease of the Tomato.
Mycol. Rept. of the 8th Ann. Rept. Exp. Sta. Cheshunt, pp. 34-36.
- BEWLEY W.F. (1922). - Report of the Mycologist.
Cheshunt Exp. Sta., Ann. Rep., 7, 33-41 (pour 1921).
- BLAKEMAN J.P., HORNEY D. (1966). - The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia and conidia.
Trans. Br. mycol. Soc., 49 (2), pp. 227-240.
- BONALY R., REISINGER O. (1971). - Etude des modifications chimiques et ultrastructurales de la paroi de trois levures du genre *Rhodotorula* cultivées sur deux milieux différents.
C.R. Acad. Sc. (Paris) D., 272, pp. 2309-2312.

POSSANYI G. (1973). - Contribution à l'étude ultra-structurale des interactions entre le blé et son parasite obligatoire : Le *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*.

Thèse de Maîtrise-es-Sciences, Université de Laval, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, 148 p.

BRACKER C.E. (1968). - Ultrastructure of the haustorial apparatus of *Erysiphe graminis* and its relationship to the epidermal cell of barley.

Phytopathology, 58, pp. 12-30.

BRACKER C.E., LITTLEFIELD L.J. (1973). - Structural concepts of host-pathogen interfaces.

In : Fungal Pathogenicity and the plant response. Academic Press, pp. 159-313.

CHESTER C.G.C., HORNBY D. (1965). - II - Alternative hosts tests and tomato fruit. Inoculation using typical tomato root isolate.

Trans. Brit. Mycol. Soc., 48 (4), pp. 583-594.

CHOU (1969). - An electron-microscope study of host penetration and early stages of Haustorium formation in *Peronospora parasitica* on cabbage cotyledons.

Ann. Bot. (London), 34, pp. 189-204.

CALONGE F.D. (1969). - Ultrastructure of the haustoria or intracellular Hyphae in four different Fungi.

Arch. Mikrobiol. , 67, pp. 209-225.

COFFEY M.D. , PALEVITZ B.A., ALLEN P.J. (1972). - Ultrastructural changes in rust infected tissues of flax and sunflower.

Can. J. Bot., 50, pp. 1485-1492.

CARASSO N., THIERY J.P., FAVARD P. (1970). - Mise en évidence par méthode cytochimique de glycoprotéines dans diverses structures (dont le réticulum endoplasmique) d'un cilié péritriche.

J. Microscopie, 9, pp. 201-220.

- DAVET (1970). - La pourriture brune des racines de Tomate au Liban.
Cah. OPSTOM, série Biol., (12), pp. 65-82.
- DELON R. (1972). - Etude structurale et ultrastructurale de *Lycopersicon esculentum* Mill. var. Marmande parasité par *Pyrenochaeta lycopersici* Gerlach, Schneider
Thèse de spécialité en Agronomie, U.E.R. P.C.B. der
Université Nancy I, 55p.
- DELON R., REISINGER O., MANGENOT F. (1973). - Etude aux microscopes photonique et électronique de racines de Tomates var. "Marmande" atteintes de maladie liégeuse.
Ann. Phytopathol., 5 (2), pp. 151-162.
- DELON R. (1974). - Localisation d'activités polyphénoloxidasiques et peroxydasiques dans les cellules racinaires de *Lycopersicon esculentum* Mill. (var. Marmande) parasitées par *Pyrenochaeta lycopersici* Gerlach et Schneider.
Phytopathol. Zeitschrift, (Dtsch.) (Sous presse).
- DICKSON B.T. (1925). - Taxonomic studies of the organism causing "Black dot" disease of Potato.
Phytopathology, 15, p. 300.
- DICKSON B.T. (1926). - The "Black dot" disease of Potato.
Phytopathology, 16, pp. 23-29.
- EBREN M.H., WILLIAMS P.H. (1956). - Brown root rot of Tomatoes. I. The associated fungal flora.
Ann. Appl. Biol., 44 (3), pp. 425-436.
- EDWARDS H.F., ALLEN P.J. (1970). - A fine structure study of the primary infection process during infection of Barley by *Erysiphe graminis*.
Phytopathology, 60, pp. 1504-1509.
- EHRLICH M.A., SCHAEFFER J.F., EHRLICH H.G. (1968). - Lomasomes in wheat leaves infected by *Puccinia graminis* and *Puccinia recondita*.
Can. J. Bot., 46, (17), pp. 17-20.

- ELLIS M.B. (1971). - Dematiaceous Hyphomycetes.
608 P.
Edit. Commonwealth Mycological Institute
Kew, SURPEY, England.
- FARKAS G.L., KIRALY (1962). - Role of phenolic compounds
in the physiology of plant diseases and
disease resistance.
Phytopathol. Zeitschrift (Dtsch), 44, (2),
pp. 105-150.
- FEHRMANN H., DIMOND A.E. (1967). - Peroxidase activity
and *Phytophthora* resistance in different or-
ganes of Potato plants.
Phytopathology, 57 (1), pp. 69-72.
- FELLOWS H. (1928). - Some chemical and morphological
phenomena attending infection of the wheat
plant by *Ophiobolus graminis*.
J. Agr. Res., 37, pp. 647-661.
- FORLOT P. (1965). - Contribution à l'étude de *Colletot-
richum coccodes* (Wallr) Hughes.
Thèse de Docteur-Ingénieur, Faculté des Sciences,
Université de Nancy, 123 P.
- VAN FLEET D.S. (1962). - Histochemistry of enzymes in plant
tissues. In : Handbuck der Histochemie.
Band VII. 2. Teil, pp. 1-38.
G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- FRANK P. (1883). - Ueber einige neue und weniger bekannte
Pflanzenkrankheiten.
Ber. dtsch. Bot. Ges., I, pp. 29-34 et 58-63.
- GERLACH W., SCHNEIDER R. (1964). - Nachweis eines *Pyrenö-
chaeta* stadiums bei Stämmen des Korkwurzeler-
regers der Tomate.
Phytopathol. Zeitschrift, 50, (3), pp. 262-269.
- GIRBARDT M. (1969). - Submikroskopische Cytologie der
Pilzzelle.
Fortsch. d. Bot. (Dtsch) 31, pp. 45-52.

- GORDON R.A., ALLDPIDGE N.A. (1971). - Cytochemical localisation of peroxidase in developping stem tissue of extreme dwarf Tomato.
Can. J. Bot., 49 (8), pp. 1487-1496.
- GRIFFITHS D.A. (1971). - The development of lignitubers in roots after infection by *Verticillium dahliae*. Kleb.
Can. J. Bot., 47, pp. 701-706.
- GRIFFITHS D.A., CAMPBELL (1972). - Fine structure of conidial development in *Colletotrichum atramentarium*.
Trans. Br. mycol. Soc., 59 (3), pp. 483-489.
- GRIFFITHS D.A., CAMPBELL W.P. (1973). - Fine structure of conidial germination and appressorial development in *Colletotrichum atramentarium*.
Trans. Br. mycol. Soc., 61 (3), pp. 529-536.
- HARDWICK N.V., GREENWOOD A.D., WOOD R.K.S. (1971). - The fine structure of the haustorium of *Uromyces appendiculatus* in *Phaseolus vulgaris*.
Can. J. Bot., 49, pp. 383-390.
- HANKSWORTH D.L., WELLS H. (1973). - Ornamentation of the terminal hairs in *Chaetomium* KUNZE ex FR. and some allied genera.
Edit. by C.A.B. KEW, SURREY, England, 24 p.
- HEPLER P.K., RICE R.M., TEPANOVA W.A. (1972). - Cytochemical localization of peroxidase activity in wound vessel members of *Coleus*.
Can. J. Bot. 50, pp. 977-983.
- HESS W.M. (1969). - Ultrastructure of Onion roots infected with *Pyrenochaeta terrestris*, a fungus parasite.
Amer. J. Bot., 56 (8), pp. 832-844.
- HOLLAND A.A., FULCHER P.G. (1971). - A study of Wheat roots infected with *Ophiobolus graminis* Sacc using fluorescence and electron microscopy.
Aust. J. Biol. Sci., 24, pp. 819-823.

- HUGHES S.J. (1958). - Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis.
Can. J. Bot., 36, pp. 727-836.
- JAKUBCZYK H. (1962). - Z badan nad pasozytnictwem *Colletotrichum atramentarium* : wystepujacego na pomidoach : I. Badania nad niektórymi wlosciwosciami biologicznymi *Colletotrichum atramentarium*.
Acta Agobotanica, Pologne, XII, pp. 207-259.
- JENSEN T.E., VALDOVINOS J.G. (1968). - Structure of microbodies in abscission cells.
Plant physiol., 43 (12), pp. 2062-2065.
- JENNINGS P.H., BRANNAMAN B.L., ZSCHEILE F.P. (1969). - Peroxidase and polyphenoloxidase activity associated with *Helminthosporium* leaf spot of maize.
Phytopathol., 59, (7), pp. 963-967.
- KILBERTUS G., MANGENOT F., REISINGER O. (1973). - Cellulolyse in vitro. Technique d'étude et vérification électronique.
Mycopath. Mycol. appl., 49 (1), pp. 101-107.
- LAST F.T., EBBEN M.H., READ W.H. (1966). - Features of Tomato brown root rot and its control.
Scientific Horticulture, 18, pp. 36-49.
- LISON L. (1960). - Histochemie et Cytochemie animales. Principes et Méthodes. Vol. I et II (832P.).
Ed. Gauthier-Villars, Paris.
- LITTLEFIELD L.J., PRACKER C.E. (1972). - Ultrastructural specialization at the host-pathogen interface in rust-infected flax.
Protoplasma, 74, pp. 271-305.
- MAC NEILL B.H. (1955). - *Colletotrichum* root rot of greenhouse Tomatoes.
Plant. Dis. Repr., 39, (1), pp. 45-46.

- MATSUSHIMA H. (1971). - The microbody with a cristalloid Core in tobacco cultured cell clone XD 6S.
I. Cytochemical studies on the microbody.
J. of Electron Microscopy, 20, n°2, pp. 38-45.
- Mc KEEN W.E., SMITH R., BHATTACHARA (1969). - Alterations of the host wall surrounding the infection peg of powdery mildew fungi.
Can. J. Bot., 47 (5), pp. 701-706.
- Mc KEEN W.E., KIMMER S.R. (1973). - Initial penetration process in powdery mildew infection of susceptible Barley leaves.
Phytopathology, 63, pp. 1049-1053.
- MARCHANT R., ROEARDS A.W. (1968). - Membranes systems associated with plasmalemma of plant cells.
Ann. Bot., 32, pp. 457-471.
- MARTY D. (1971). - Peroxysomes (= microbodies) associés aux plastes des zones non chlorophylliennes des feuilles panachées de *Coleus blumei* Benth.
C.R. Acad. Sci., Paris, Série D, 273, pp. 860-63.
- MENDGEN K., FUCHS W.H. (1973). - Elektronenmikroskopische Darstellung peroxydatischer Aktivitäten bei *Phaseolus vulgaris* nach Infektion mit *Uromyces phaseoly typica*.
Arch. Mikrobiol., 88, pp. 181-192.
- MOORE R.T. (1965). - The ultrastructure of fungal cells.
In : The Fungi, I, pp. 95-118.
Academic Press, New-York.
- OLAH G.M., PINON J., JANITOR A. (1971). - Modifications ultrastructurales provoquées par *Puccinia graminis* F sp. *tritici* chez le Blé.
Mycopath. Mycol., appl., 44 (4), pp. 325-346.
- OLAH G.M., REISINGER O. (1974). - Etude ultrastructurale et cytochimique de l'appareil sporifère chez *Phialophora richardsiae* (Naunf) Conant.
Can. J. Bot. (Sous presse).

- ORCIVAL J. (1969). - Infrastructure des suçoirs et relations hôte-parasite dans des stades écidiens d'Urédinales.
C.R. Acad. Sci., Paris, 269, Série D, pp. 1973-1975.
- PANESSA B.J., GENNARO J.F. (1972). - Preparation of fragile botanical tissues and examination of intracellular contents by S.E.M.
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY part. II, pp. 327-334.
- PAYEN J. (1965). - La "Méthode des Appâts" et ses applications en phytopathologie.
I. Définition, revue bibliographique et applications à la prévision de la fonte des semis de Betterave.
Bull. Ecole Nat. Sup. Agro., Nancy, VII, I, pp. 29-54.
- PEYTON G.A., BOWEN C.C. (1963). - The host-parasite interface of *Peronospora manshurica* on glycine max.
Amer. J. Bot., 50, pp. 787-797.
- PHILLIPS J.M., HAYMAN D.S. (1970). - Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection.
Trans. Br. Mycol. Soc., 55 (1), pp. 158-160.
- PINON J.D., BOSSANYI G.Y., OLAH G.M. (1972). - Changements ultrastructuraux observés dans les cellules de Blé infecté par *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*.
Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 7 (1-3), pp. 21-39.
- POUX N. (1972). - Localisation d'activités enzymatiques dans le méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. IV. Réactions avec la diaminobenzidine mise en évidence de peroxysomes.
J. Microscopie, 14, pp. 183-218.
- PREFCE T.F. (1964). - Observations on the corky root disease of Tomatoes in England.
Trans. Brit. Mycol. Soc., 47, pp. 375-379.

- RAUTFLA G.S., PAYNE M.G. (1970). - The relationship of peroxidase and orthodiphenol oxidase to resistance of sugar beets to *Cercospora* leaf spot.
Phytopathology, 60 (2), pp. 238-245.
- REISINGER O. (1972). - Contribution à l'étude ultrastructurale de l'appareil sporifère chez quelques Hyphomycètes à parois mélanisées.
Thèse de Doctorat es-Sciences nat., U.E.R. P.C.P., Université Nancy I.
- REISINGER O., OLAH G.M. (1974). - Etude ultrastructurale et cytochimique de la conidiogénèse chez *Beauveria bassiana*. (BALS) Vuill.
Can. J. Microbiol. (Sous presse).
- REISINGER O., KILBERTUS G. (1973). - Biodégradation et humification. IV. Microorganismes intervenant dans la décomposition des cellules d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud.
Can. J. Microbiol., 20, pp. 299-306.
- REYNOLDS E.S. (1963). - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol., 17, pp. 208-212.
- RICHARDSON J.K., BERKELEY G.H. (1944). - Pasal rot of Tomato.
Phytopathology, U.S.A., 34, pp. 614-621.
- ROLAND J.C., SANDOZ D. (1969). - Detection cytochimique des sites de formation des polysaccharidiques prémembranaires dans les cellules végétales.
J. Microscopie, 8, pp. 263-268.
- ROQUEBERT M.F., ABADIE M. (1973). - Etude ultrastructurale de la sporogénèse chez un micromycète *Stilbothamnium nudipes* Haum.
C.R. Acad. Sc. (Paris), D, 276, pp. 2883-2885.

- ROUGIER M., VIAN B., GALLANT D., ROLAND J.C. (1973). - Aspects cytochimiques de l'étude ultra-structurale des polysaccharides végétaux. Ann. Biol., XII, (1,2), pp. 43-75.
- SCHMIEDEKNECHT M. (1956). - Untersuchungen des Parasitismus von *Colletotrichum atramentarium* (B. er Br.) Taubh. an Kartoffelstauden. Phytopathol. Zeitschrift, 21 (1), pp. 1-30.
- SCHMIEDEKNECHT M. (1957). - Beitrag zur Morphologie und Cytologie von *C. atramentarium*. Phytopathol. Zeitschrift, 29 (3), pp. 333-345.
- SCHMIEDEKNECHT M. (1959). - Appressorien und Chlamydosporen von *C. atramentarium*. Arch. Mikrobiol., 34 (4), pp. 339-345.
- STEVENS F.L. (1931). - The ascigerous stage of *Colletotrichum lagenarium* induced by ultraviolet irradiation. Mycologia, 23, pp. 134-139.
- SWIFT Y.A. (1968). - The electron histochemistry of cystine-containing proteins in thin transverse sections of human hair. J. Roy. Micr. Soc., 88 (4), pp. 449-460.
- TEMMINK J.H.M., CAMPBELL R.N. (1968). - The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. Can. J. Bot., 46, pp. 951-956.
- TERMOHLEN G.P. (1962). - Onderzoekingen over kurkwortel van Tomaat en over de Kurkwortelschimmel. T. Pl. Ziekten, 63, pp. 369-374.
- THIERY J.P. (1967). - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6, pp. 987-1017.
- THORNTON R.M., THIMANN K.V. (1964). - On a crystal containing body in cells of the Oat coleoptile. J. of Cell Biol., 20, pp. 313-319.

- WERLEY D.M., JONES D. (1971). - Biological transformation of microbial residus in soil.
In Soil Biochemistry, Vol. II, pp. 446-485.
Ed. Ma Larer et Skwins.
- WHITE J.A., CALVERT O.H., BROWN M.F. (1973). - Ultrastructural changes in corn leaves after inoculation with *Helminthosporium maydis*, Race T.
Phytopathology, 63 (2), pp. 296-300.
- WILHEM St. (1956). - A sand culture technique for the isolation of fungi associated with roots.
Phytopathology, 46 (5), pp. 293-294.
- WILLIAMS P.H. (1929). - Fungi occuring in Tomatoes roots.
Rep. Exp. Res. Sta. Cheshunt, 14, p. 42.
- ZALOKAR M. (1965). - Integration of cellular metabolism.
In :The Fungi I. , pp. 375-426.
Ainsworth and Sussman Ed. Academic Press, New-York.

P L A N C H E S

A P P R E V I A T I O N S

- A : Couche externe, généralement amorphe, de la paroi fongique.
- ap : Appressorium.
- B : Paroi primaire de la cellule fongique.
- Co : Conidie.
- cw : Corps de Woronin.
- DP : Dépôt pariétal.
- G : Glycogène.
- L : Corps entrant probablement dans l'ontogénie des lipides et les lipides.
- Li : Lignituber.
- Lm : Corps multivésiculeux.
- Lo : Corps pariétaux.
- M : Mycélium.
- mc : Plasmalemmme.
- mi : Mitochondrie.
- mo : Microbodie.
- N : Noyau.
- ne : Nucléole.
- PC : Paroi cellulaire.
- pl : Plaste.
- pf : Protéines fibrillaires.
- Py : Phialides.
- r : Ribosomes et polyribosomes.
- re : Réticulum endoplasmique.
- S : Septum.
- V : Vacuole.
- ve : Vésicules.
- ZM : Zone mucilagineuse.

P L A N C H E I

P. lycopersici

=====

Fig. 1 : Lignitubers (Li) dans une cellule vivante en contact avec le parasite. Le plasmalemme (mc) appliqué contre la paroi (PC) du végétal présente des corps pariétaux (Lo). Le cytoplasme renferme de nombreuses mitochondries (mi), un réticulum endoplasmique (re) de type granulaire et des dictyosomes (Go).

Le contenu de la cellule parasitée est lysé, et on y remarque de nombreuses substances denses aux électrons.

fix. Os O₄

G : 13.000

Fig. 2 : Lignitubers (Li) observés sous diverses orientations (flèches). Coloration par le bleu trypan.

(M. photonique).

G : 1.000

Fig. 3 : Système racinaire de plant présentant des manchons bruns liégeux caractéristiques du "corky-root".

Fig. 4 : Détail d'une racine attaquée.

Fig. 5 : Mycélium qui, en se développant, a tendance à s'agglomérer dans certaines cellules corticales (flèches). Début de la formation de microsclectotes. (M. photonique).

G : 1.000

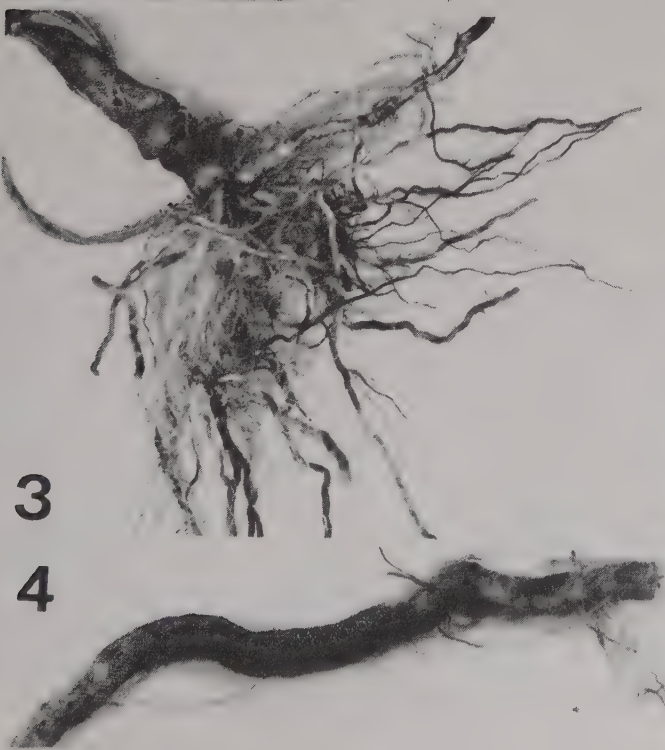
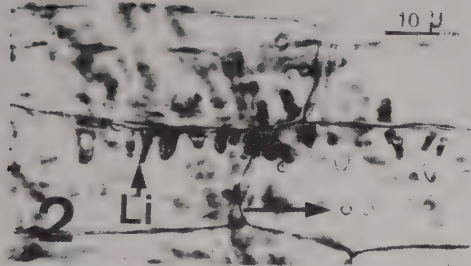


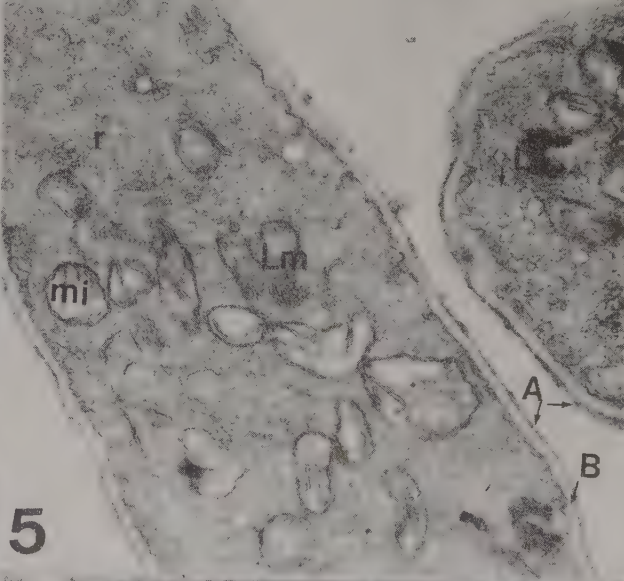
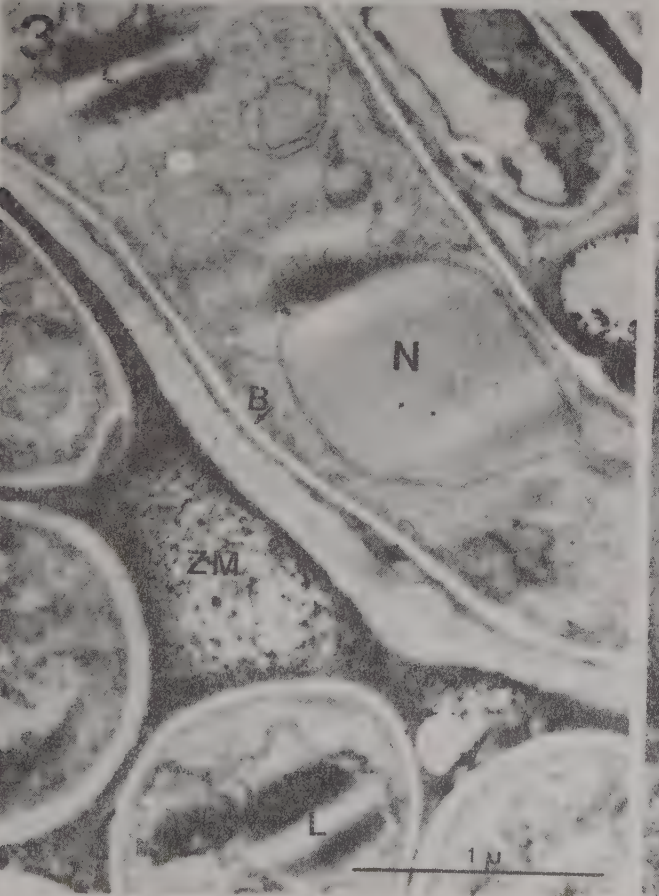
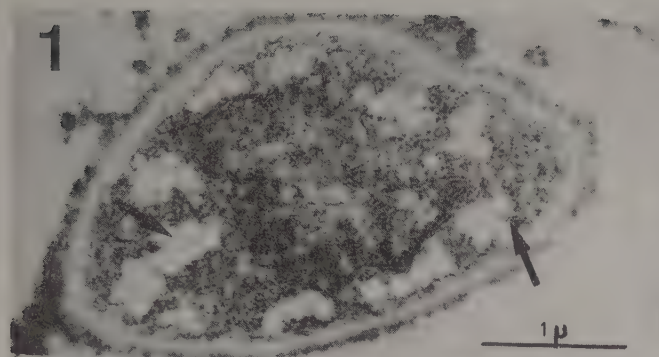
PLANCHE II

P. lycopersici : Le mycélium

00000 00000 00000 00000 00000
 00000 00000 00000 00000 00000

- Fig. 1 : Formations de type viral (flèches) dans une hyphe intracellulaire.
Fix. Os O₄ G : 19.000
- Fig. 2 : Cloison typique (S) avec perforation septale et corps de Woronin (cw) associé.
Fix. KMnO₄ G : 19.000
- Fig. 3 : Hyphes provenant d'une culture en milieu liquide, élaborant une couche mucilagineuse (ZM) importante.
Fix. Os O₄ G : 34.000
- Fig. 4 : Coupe transversale d'une hyphe provenant d'une culture en milieu gélosé. La paroi épaisse est formée par les couches A et B. Noter les perforations de la membrane nucléaire, le réticulum endoplasmique et les mitochondries.
Fix. KMnO₄ G : 37.000
- Fig. 5 : Constituants cytologiques d'une hyphe intracellulaire jeune, à paroi peu différenciée. Nombreuses mitochondries (mi), corps multivésiculeux (Lm) et ribosomes (r).
Fix. Os O₄ G : 20.000
- Fig. 6 : Mycélium caractéristique obtenu en culture sur milieu gélosé. Les loges hyphales sont plus ou moins renflées et en forme de "poire". (M. photonique).

planche II



P L A N C H E I I I

P. lycopersici : Etude cytochimique

=====

. Mise en évidence des polysaccharides (THIERY).

Fig. 1 : Perforation septale fermée par un corps de Woronin (cw) entre une loge vivante et une loge morte. Réaction intense au niveau du plasmalemme (mc) et à la périphérie du corps de Woronin.

Fix. Os O₄ T.C.H. (6h) G : 28.000

Fig. 2 : Cellules fongiques contenant du glycogène (flèches) très marqué par la réaction de THIERY.

Fix. Os O₄ T.C.H. (6h) G : 30.000

. Mise en évidence des substances protéiques (GOMORI-SWIFT).

Fig. 3 : Réaction intense au niveau de la partie externe de la paroi et du centre des corps de Woronin.

Fix. Os O₄ G : 35.000

Fig. 4 : Zone mucilagineuse fortement marquée : couche B à réaction plus faible.

Fix. Os O₄ G : 30.000



P L A N C H E IV

P. lycopersici : Les pycnides

=====

Fig. 1 : Conidiophore long et ramifié issu de la couche fertile de la pycnide et nombreuses conidies unicellulaires.

Fix. KMnO_4

G : 5.000

Fig. 2 : Pycnides avec soies caractéristiques autour de l'ostiole (M. photonique).

Fig. 3 : Paroi de pycnide montrant des cellules stériles fortement mélanisées.

Fix. Os O_4

G : 7.000

Fig. 4 : Coupe semi-fine d'une pycnide.

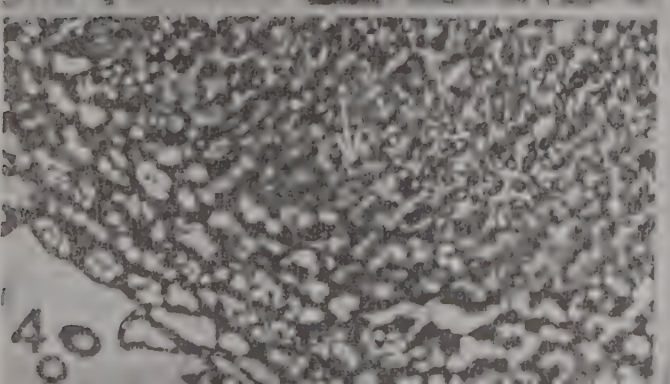
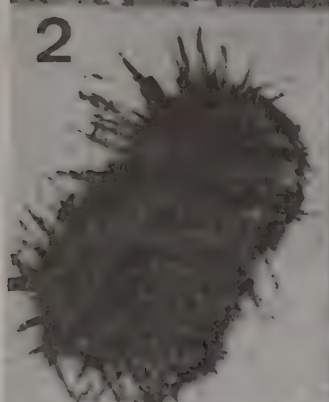
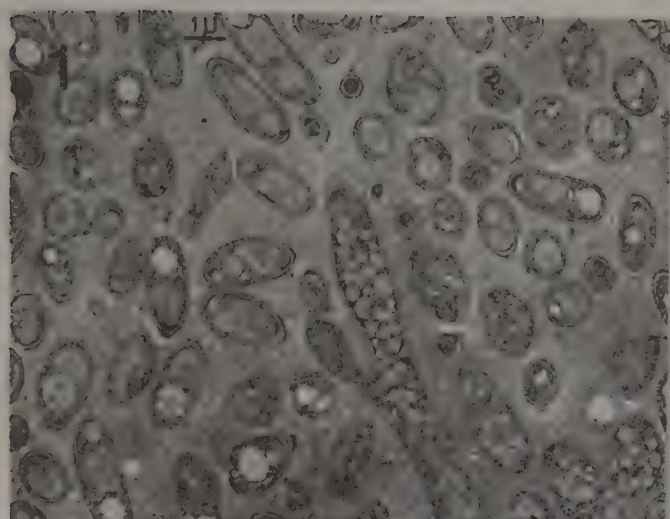
La flèche situe un conidiophore ramifié portant des conidies (M. photonique $\times 1500$).

Fig. 5 et 6 : Phialides (Py) et formation de phialoconidies contenant des inclusions lipidiques.

Fix. KMnO_4

Fig. 5 : G : 23.000

Fig. 6 : G : 31.000



P L A N C H E V

P. lycopersici : Pénétration des cellules corticales

=====

Fig. 1 : Formation d'une zone dense aux électrons (flèche), probablement d'origine enzymatique autour de l'hyphe pénétrant une protubérance (Li) située dans une cellule morte.

Fix. Os O₄

G : 28.000

Fig. 2 : Mycélium intercellulaire (M) dégradant la lamelle mitoyenne.

Fix. Os O₄

G : 20.000

Fig. 3 : Lignituber (Li) situé dans une cellule hôte altérée suggérant une élaboration par dépôts successifs.

Fix. Os O₄

G : 14.000

Fig. 4 : Pénétration du mycélium (M) à travers une protubérance (Li) chez une cellule à contenu dégradé.

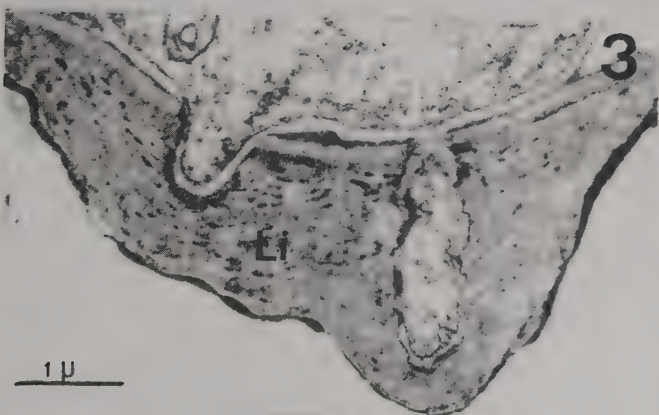
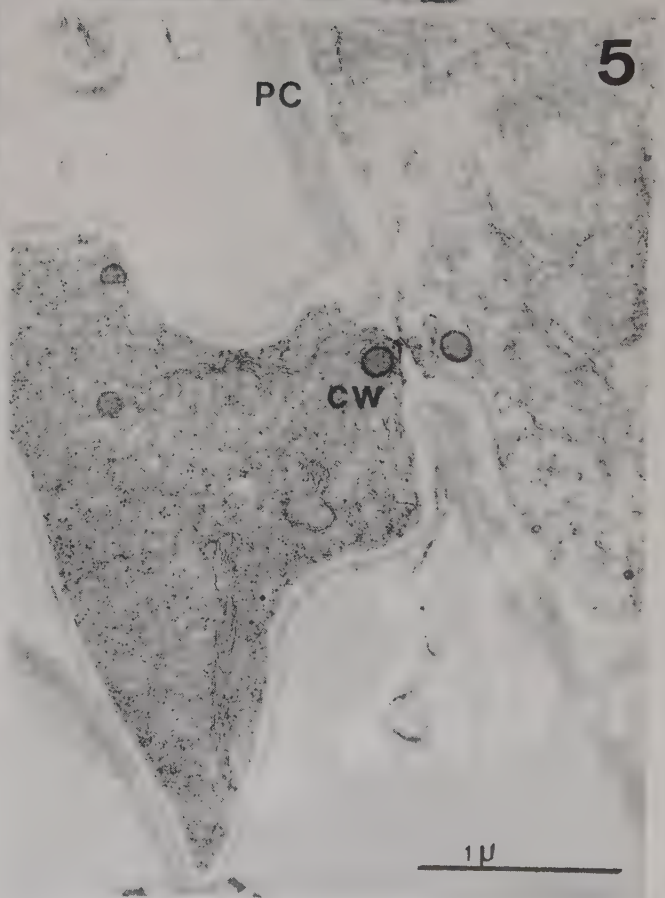
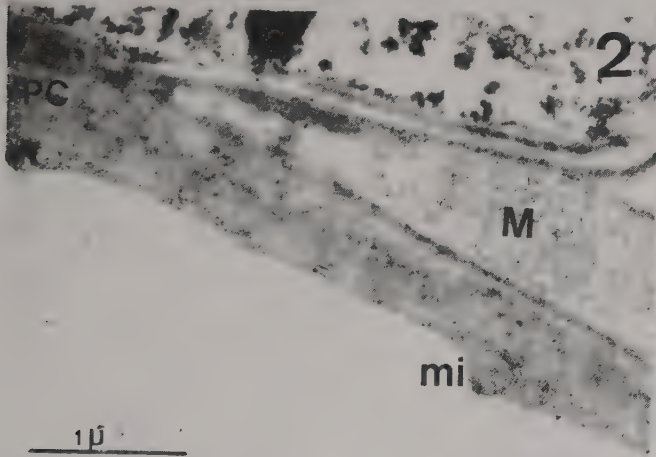
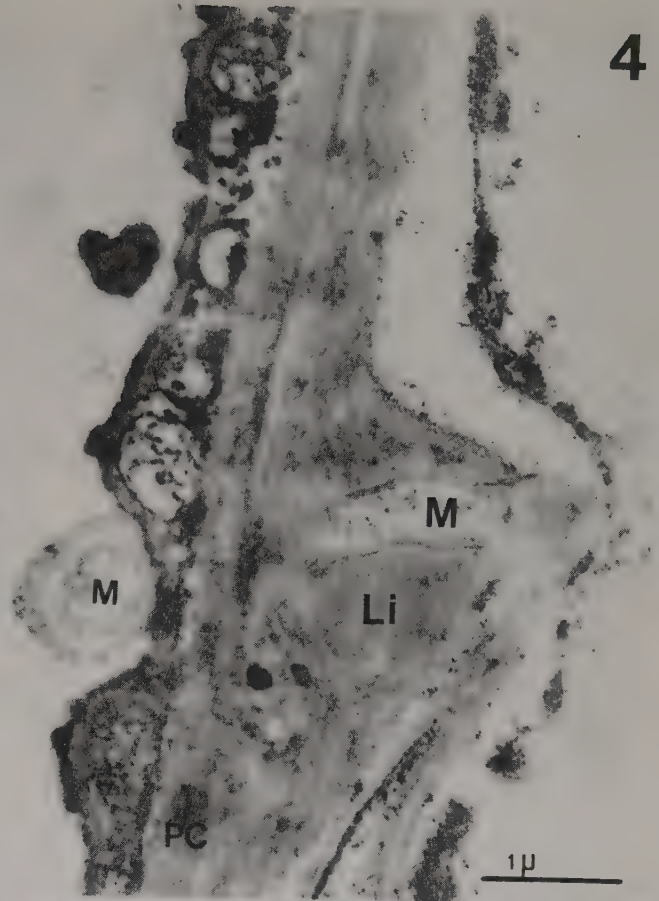
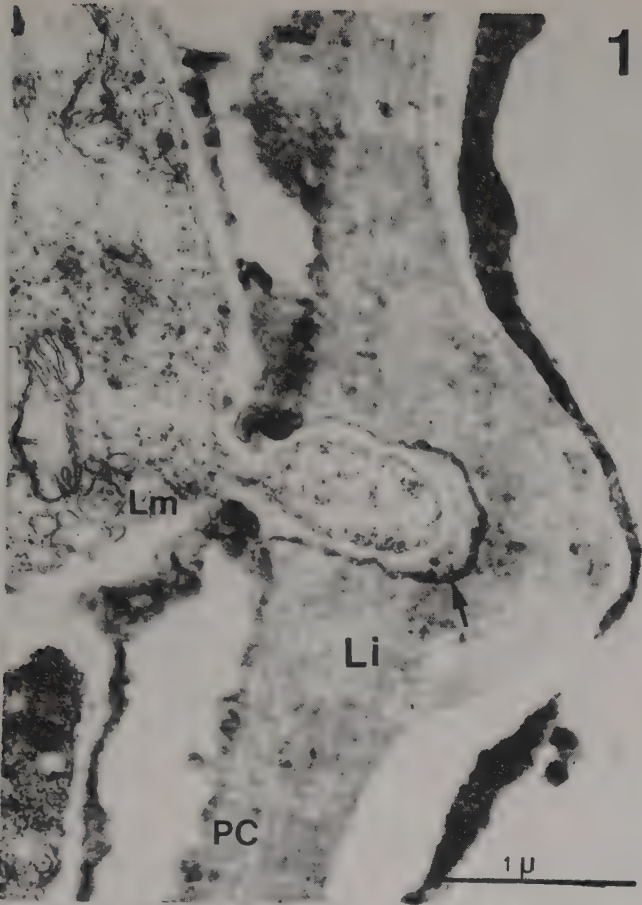
Fix. os O₄

G : 19.000

Fig. 5 : Exemple de pénétration sans formation de protubérance dans des cellules mortes. Noter la constriction de l'hyphe au niveau de la paroi cellulaire (PC), la cloison au niveau de laquelle on remarque des corps de Woronin (cw).

Fix. Os O₄

G : 19.000



P L A N C H E VI

P. lycopersici : Réactions des cellules vivantes
de l'hôte en contact avec le parasite

=====

Fig. 1 : Pénétration d'une hyphe dans une cellule vivante.
A proximité de la papille (Li), on note la présence
du noyau de la cellule hôte, ainsi que de nom-
breux organites (mi, re) et vésicules (ve).

Fix. Os O₄

G : 12.000

Fig. 2 : Mycélium (M) dans une cellule morte contenant de
nombreux granules denses aux électrons. Noter
dans le cytoplasme de l'hyphe des substances
lipidiques et les invaginations du plasmalemme
(flèches).

Apparition de corps pariétaux (Lo) entre le
plasmalemme et la paroi (PC) dans la cellule
voisine encore vivante.

Fix. Os O₄

G : 17.000

Fig. 3 : Détail d'une hyphe dégradant la paroi de l'hôte
(PC) et le lignituber (Li). On observe une
dégradation importante de la lamelle mitoyenne.

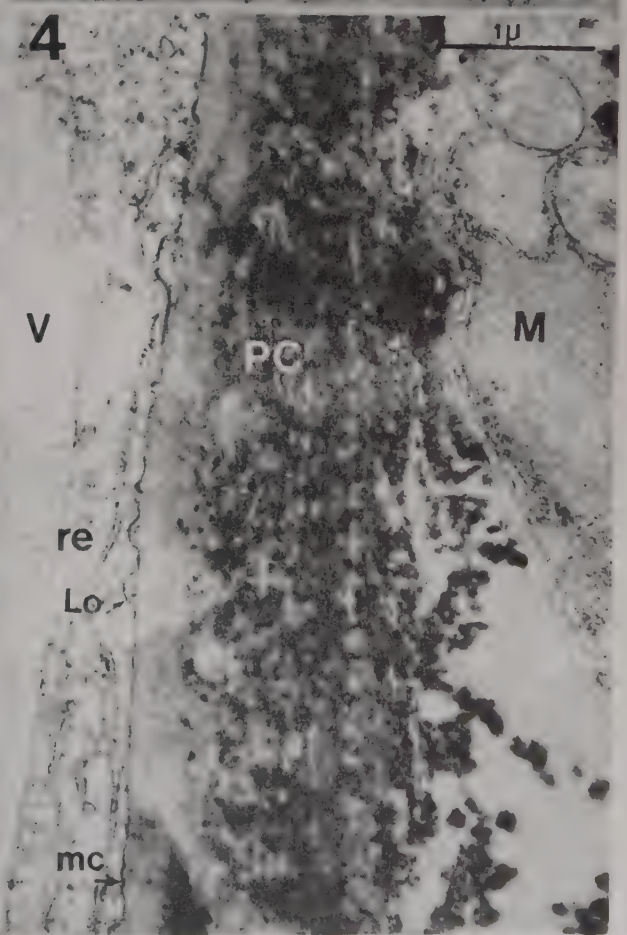
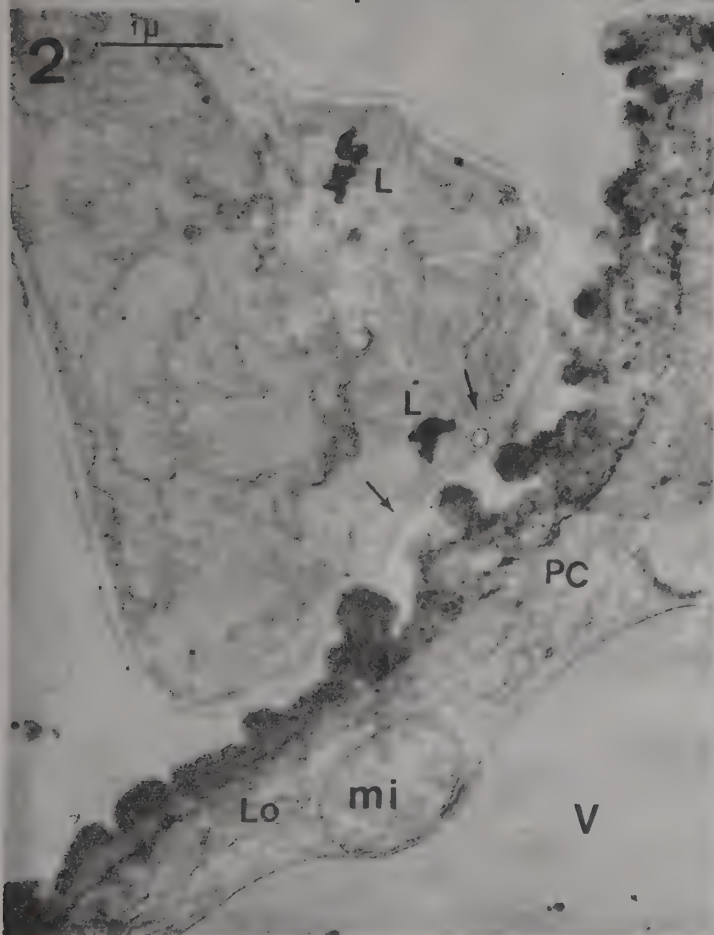
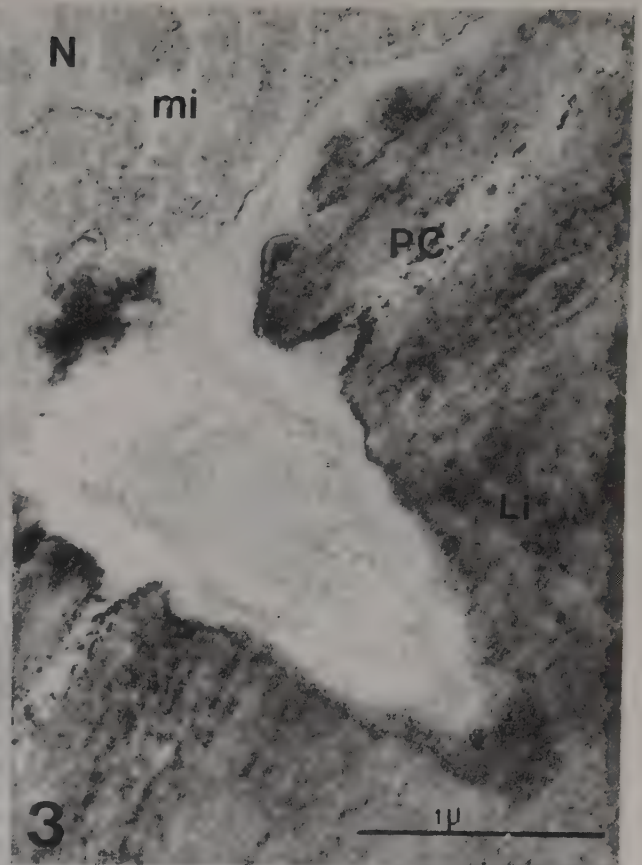
Fix. Os O₄

G : 33.000

Fig. 4 : Mycélium (M) en contact avec une cellule hôte
vivante dont le cytoplasme présente un réticu-
lum endoplasmique (re) granulaire. Apparition
de corps pariétaux (Lo) entre le plasmalemme
et la paroi (PC).

Fix. Os O₄

G : 20.000



P L A N C H E VII

P. lycopersici

=====

Fig. 1 et 2 : Structures fibrillaires d'aspect étoilé situées dans les vacuoles des cellules voisines de zones parasitées.

Fix. Os O ₄	Fig. 1 :	G : 17.000
	Fig. 2 :	G : 4.500

Fig. 3 : Coupe longitudinale de tube criblé de racine parasitée, révélant une densité importante de protéines fibrillaires (pf) au niveau des perforations et la présence de nombreux plastes(pl).

Fix. Os O ₄	G : 19.000
------------------------	------------

Fig. 4 : Coupe tangentielle dans le phloème d'une racine saine, montrant la présence de quelques protéines fibrillaires (pf) au niveau des cribles.

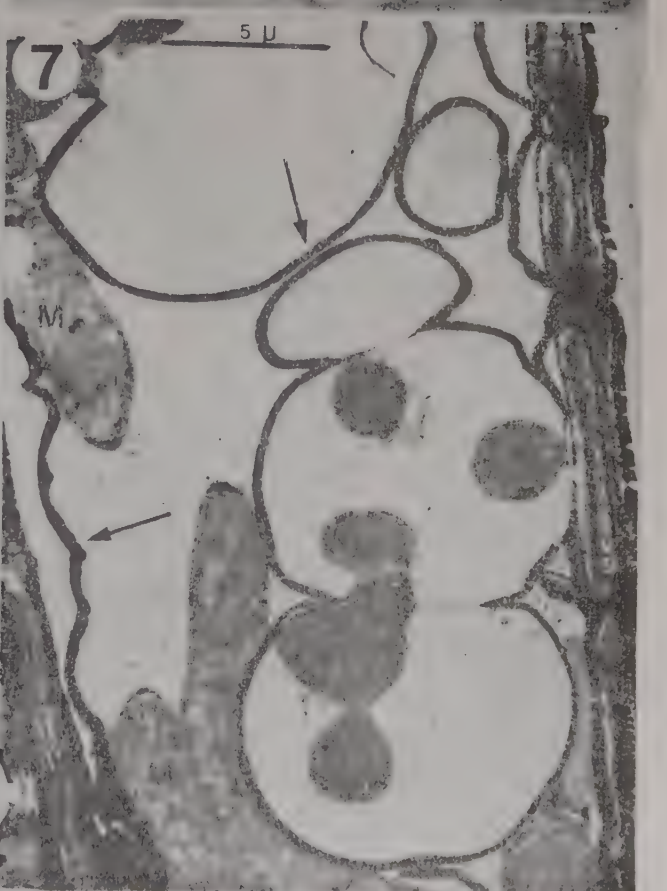
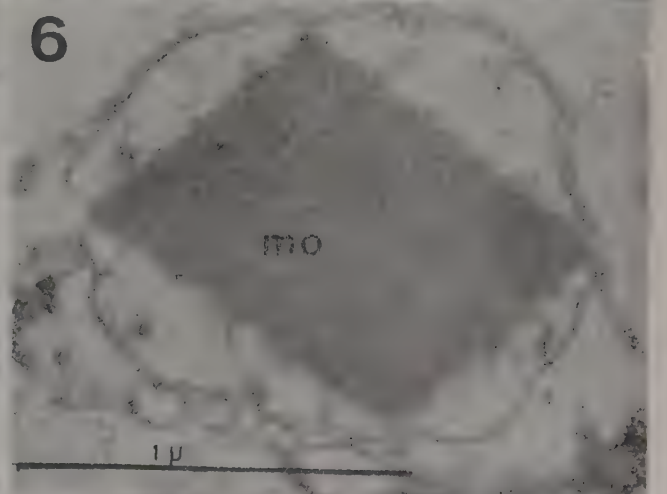
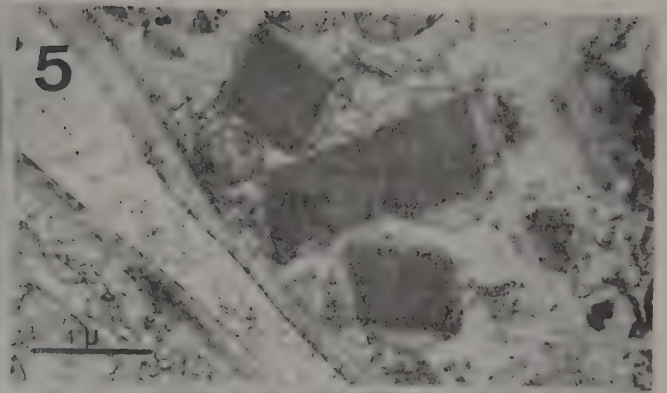
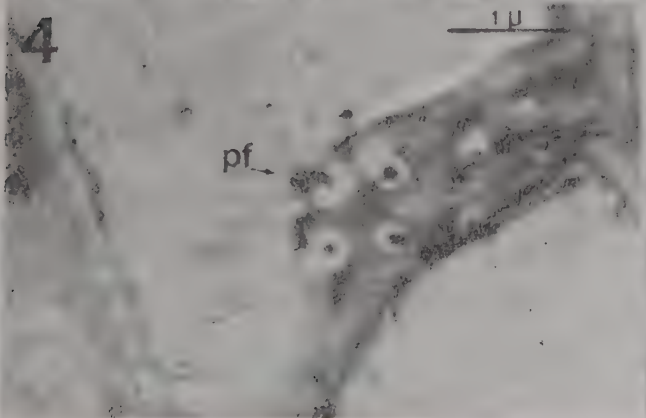
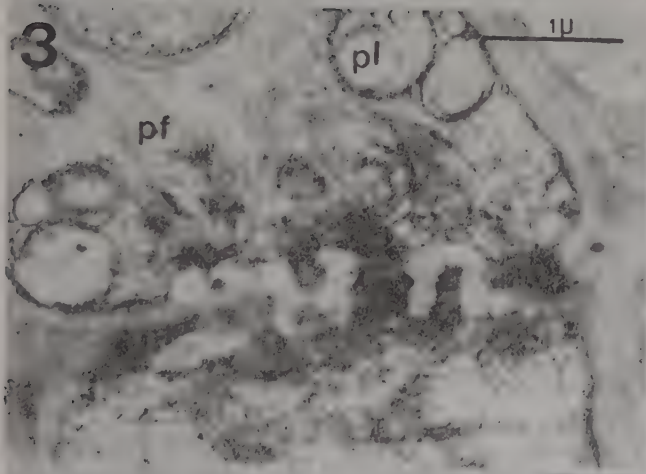
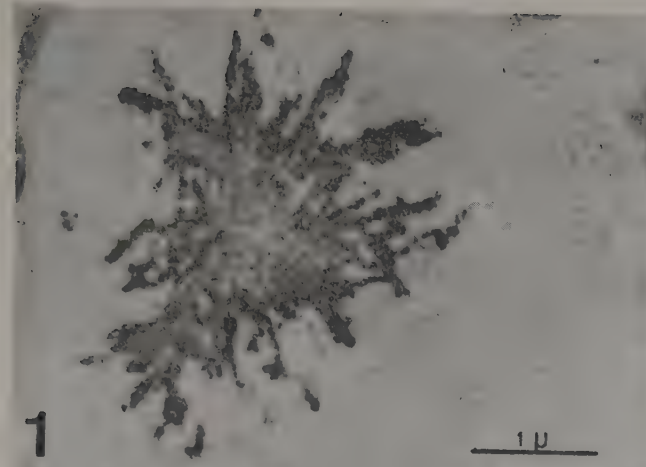
Fix. Os O ₄	G : 16.000
------------------------	------------

Fig. 5 et 6 : "Microbodies" à contenu cristallin (mo) dans le cytoplasme de cellules voisines de zones parasitées.

Fix. Os O ₄	Fig. 5 :	G : 15.000
	Fig. 6 :	G : 52.000

Fig. 7 : Vaisseau du xylème envahi par le champignon et apparition de vésicules à parois denses (flèches) ressemblant à des tyloses.

Fix. Os O ₄	G : 4.500
------------------------	-----------



P L A N C H E VIII

P. lycopersici : Etude cytoenzymologique

=====

. Activités peroxydasiques (P.O.) -

Fig. 2 et 3 : Activités P.O. décelées par la technique des zinc-leucos de LISON (1960). Racine saine (fig. 2), racine attaquée (fig. 3). La flèche situe l'endoderme.

Fig. 5 : Activités P.O. chez une plantule infectée ponctuellement (i) ; on remarque également des activités P.O. au niveau de la racine latérale.

Fig. 9 : Activités P.O. de la paroi au niveau d'un lignituber (Li). On remarque entre la paroi cellulaire et le lignituber, une surface de séparation claire aux électrons (flèches).

G : 14.000

Fig. 10 et 11 : Formation d'une zone dense aux électrons dans la paroi cellulaire en contact avec une hyphé mycélienne (M).

Fig. 10 : G : 15.000

Fig. 11: G : 25.000

Technique : Fixation dans le glutaraldéhyde, incubation dans un milieu contenant D.A.B. et H_2O_2 (60mn à 4°C, pH : 6,8), post-fixation par OsO_4 .

. Activités polyphénoloxidasiques (P.P.O.) -

Fig. 1 : Activités P.P.O. (dl. D.O.P.A.) : racine saine à gauche, racine attaquée à droite.

Fig. 4 : Activités P.P.O. chez une plantule infectée ponctuellement (i).

Fig. 6 : Le produit de la réaction (oxydation de la dl. D.O.P.A.) contraste une partie de la paroi pecto-cellulosique.

Fix. : Glutaraldéhyde ; incubation dans la dl. D.O.P.A., 2 h. à 25°C, post-fixation dans OsO_4
G : 17.000

Fig. 7 : Préparation témoin. Incubation en l'absence de substrat.
G : 13.000

Fig. 8 : Echantillon de tissus sains.

Fix. : Glutaraldéhyde, incubation dans la dl. D.O.P.A., 2h. à 25°C, post-fixation dans OsO_4 - préparations contrastées par le citrate de plomb.
G : 7.000



P L A N C H E IX

P. lycopersici : Mise en évidence
des polysaccharides
(Technique de THIERY)

=====

Fig. 1 : Hyphe présentant une membrane plasmique très marquée par les réactifs (A.P-T.C.H.-Ag), comme les corps pariétaux (Lo) situés à son niveau. Les corps multivésiculeux (Lm) intracytoplasmiques sont par contre faiblement marqués. La partie externe de la paroi fongique est elle-même dense aux électrons

G : 19.000

Fig. 2 : Hyphe dégradant la paroi de l'hôte (PC) et le lignituber (Li). La paroi fongique au niveau du point de pénétration (flèche) est très transparente aux électrons.

G : 19.000

Fig. 3 : Hyphe s'attaquant à la paroi de l'hôte (PC). On note en avant de l'hyphe, une zone plus claire (flèche) démontrant une action lytique du parasite.

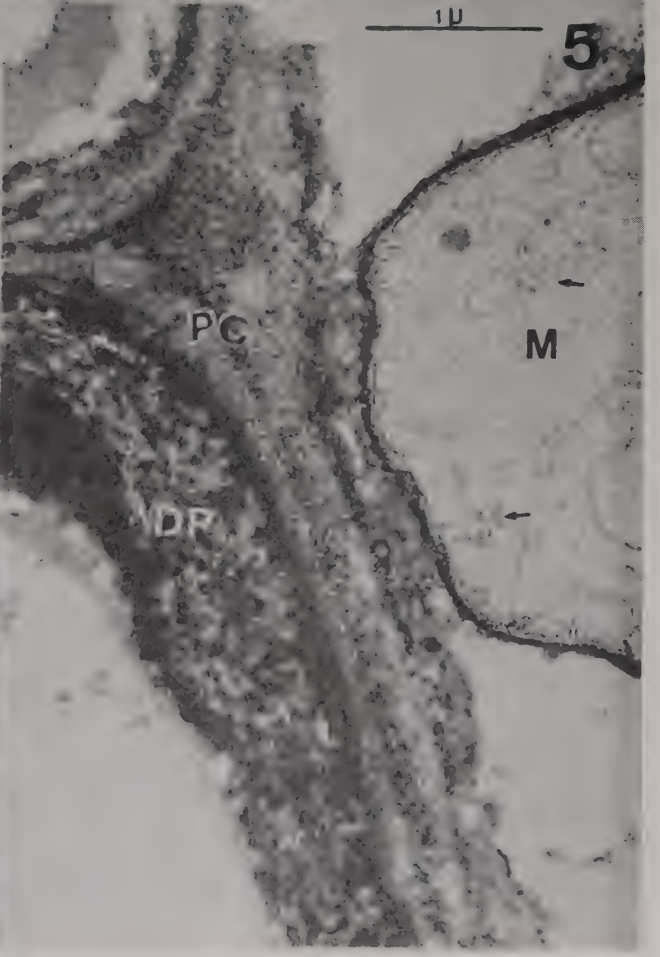
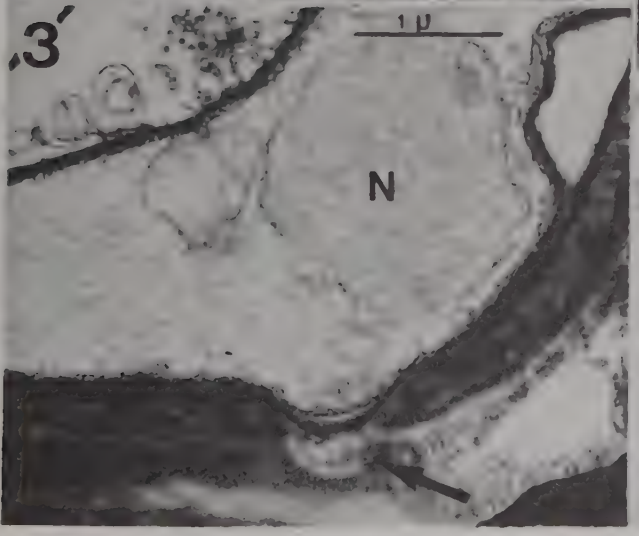
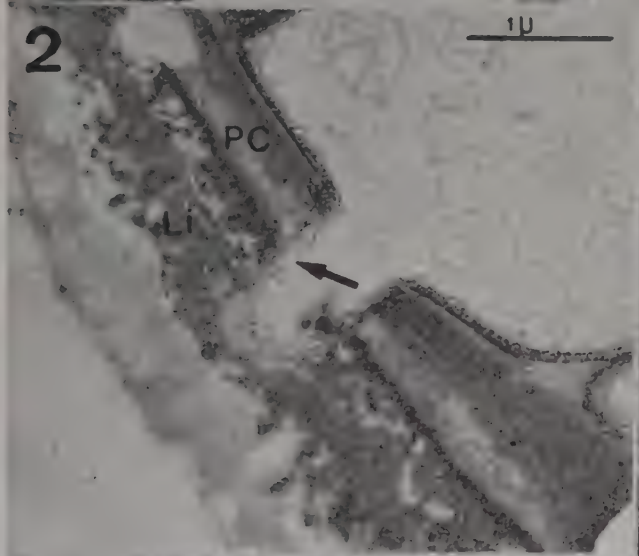
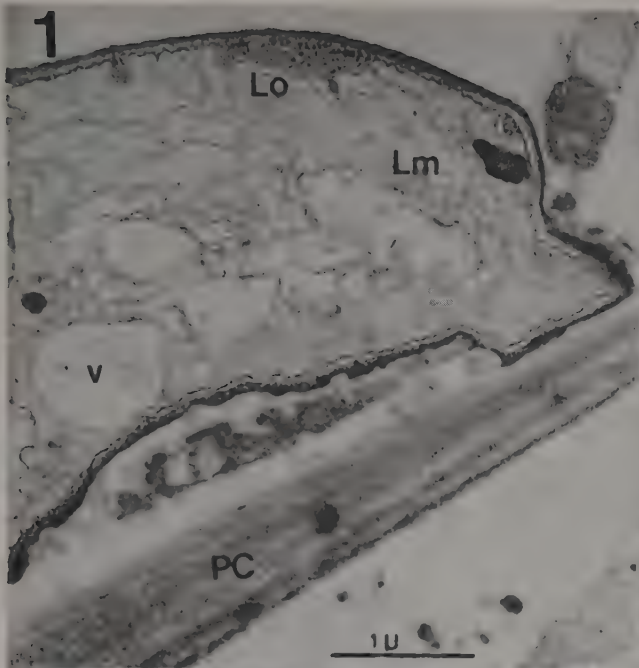
G : 19.000

Fig. 4 : Hyphe dégradant la paroi pecto-cellulosique de l'hôte. On distingue (flèche) une modification de la densité électronique de la paroi fongique au point de pénétration. Remarquer également des dépôts très contrastés dans le lumen des cellules de l'hôte.

G : 23.000

Fig. 5 : Hyphe (M) en contact avec une cellule morte, où l'on observe un dépôt pariétal (DP) réagissant de façon hétérogène au réactif de THIERY. Noter également de nombreuses vésicules très contrastées dans le cytoplasme de la cellule fongique (flèches).

G : 24.000



P L A N C H E X

P. lycopersici : Mise en évidence des protéines
contenant de la cystine (Technique de GOMORI-SWIFT)

=====

Fig. 1 : Hyphe (M) en contact avec une paroi de l'hôte très dense aux électrons. Noter la présence d'une couche (flèche) plus claire aux électrons, ainsi que des particules P_2 dans le lumen de la cellule.

G : 32.000

Fig. 2 : Particules P_3 apparaissant très contrastées, la densité augmentant de l'intérieur vers l'extérieur.

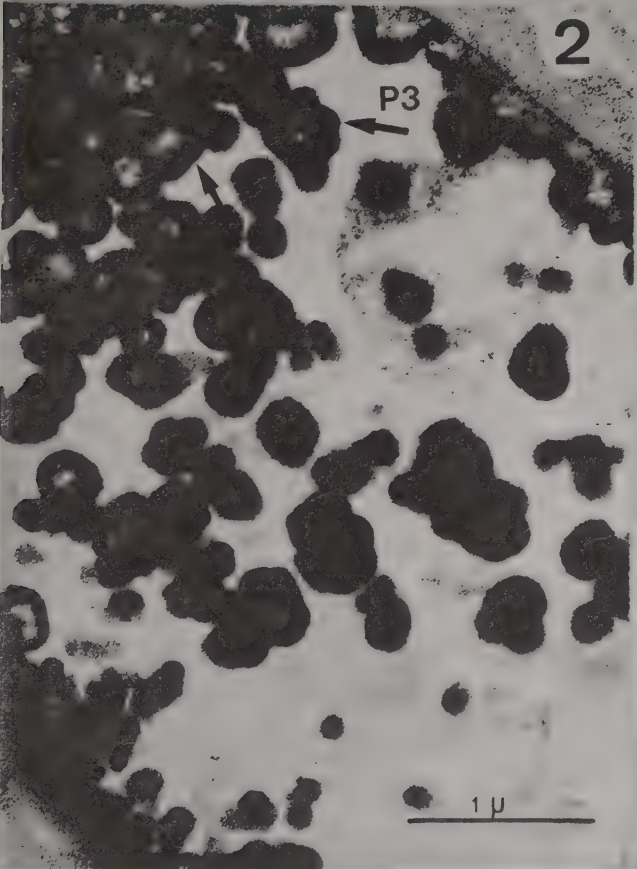
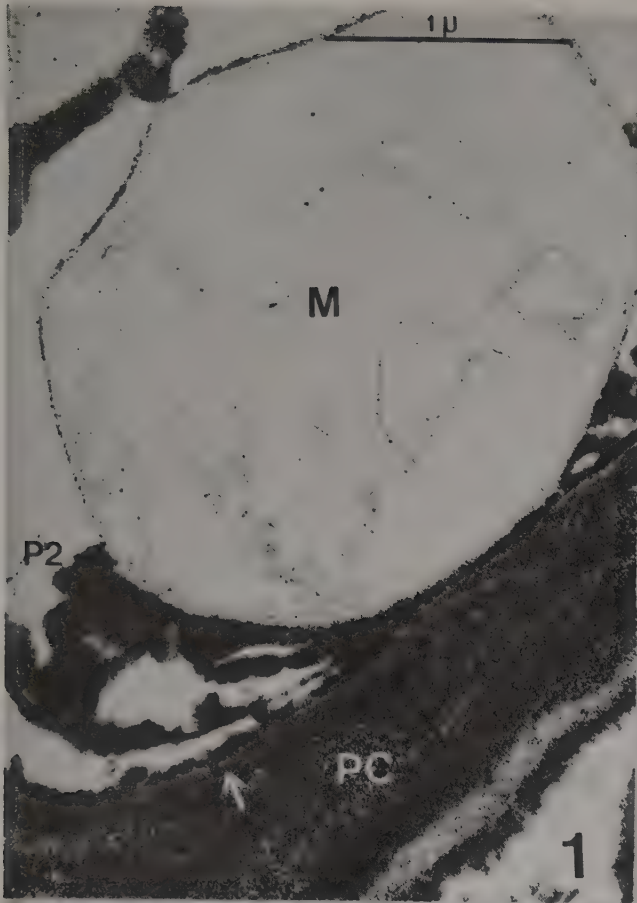
G : 24.000

Fig. 3 : Hyphe (M) pénétrant un lignituber (Li) réagissant intensément au réactif de GOMORI-SWIFT. La flèche indique une zone plus dense aux électrons, probablement d'origine enzymatique, autour de l'hyphe.

G : 14.000

Fig. 4 : Préparation témoin contrastée par le citrate de plomb : substances denses aux électrons de trois types micromorphologiques différents apparaissant dans certaines cellules dégénérées contenant le parasite (M).
Les particules P_3 de structure concentrique, montrent une densité s'accroissant de l'extérieur vers l'intérieur.

G : 10.000



P L A N C H E X I

P. lycopersici : Cortex de racines mortes
de plantes adultes

=====

Fig. 1 : Aspect extérieur des racines liégeuses en M.E.B.
(sans métallisation).

G : 100

Fig. 2 et 3 : Mise en évidence des polysaccharides
dans les parois de l'hôte (PC).

Fix. Os O₄

Fig. 2 : G : 19.000

Fig. 3 : G : 20.000

Fig. 4 : L'application de la technique de GOMORI-SWIFT
révèle la présence de "microbodies" dans le
cytoplasme des cellules altérées.

Fix. Os O₄

G : 18.000

Fig. 5 : Aspect au M.E.B. des cellules corticales tra-
versées par de nombreuses hyphes (M).

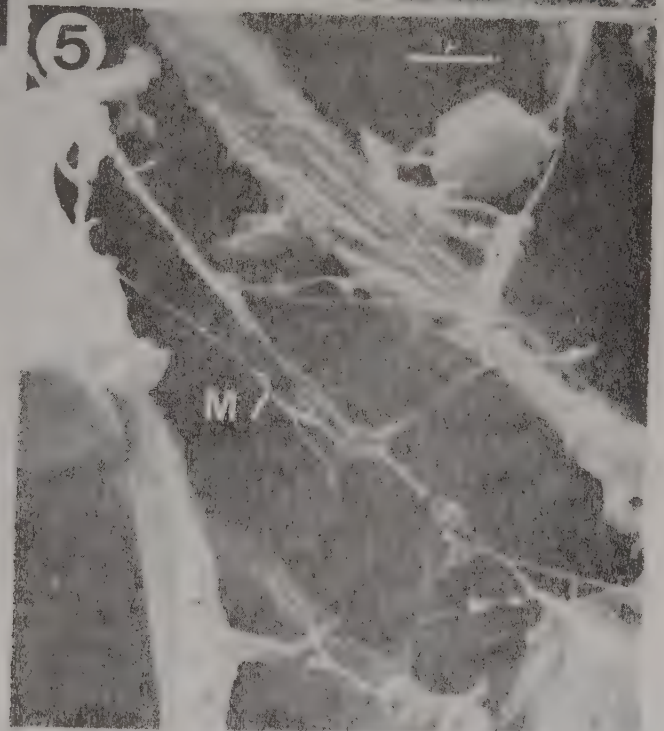
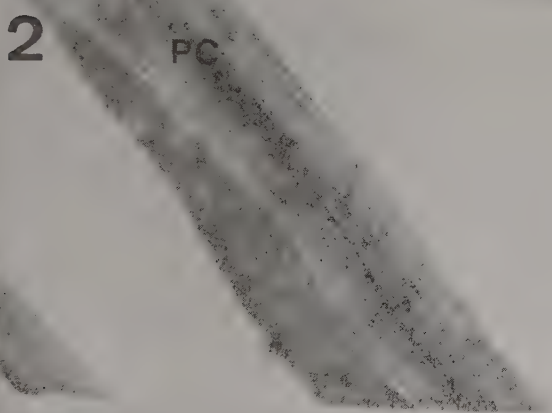
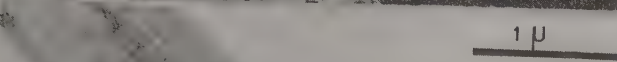
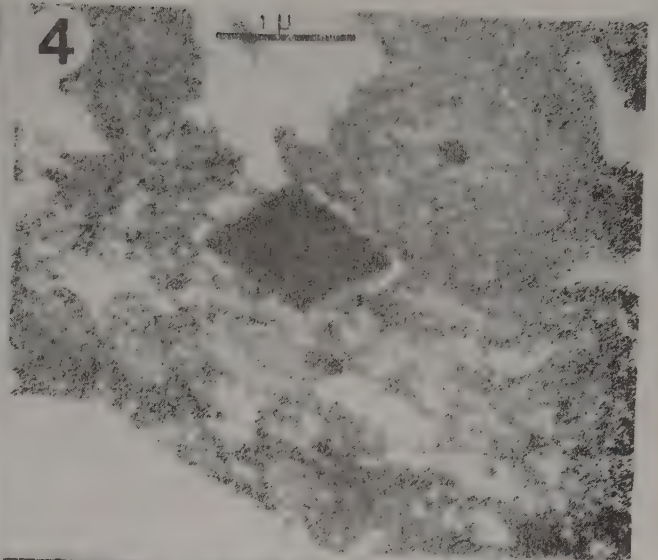
G : 10.000

Fig. 6 : Aspect du cortex après application de la
technique de GOMORI-SWIFT.

Fix. Os O₄

G : 3.600

planche XI



P L A N C H E XII

P. lycopersici : Cylindre central de racines mortes
de plantes adultes

====

Fig. 1 : Coupe transversale de racine liégeuse observée
en M.E.B. Séparation importante du cortex et
du cylindre central.

G : 60

Fig. 2 : Hyphe dans les tissus lignifiés (THIERY).

Fix. Os O₄

G : 19.000

Fig. 3 : Vaisseau du xylème traversé par des hyphes
(M) (M.E.B.).

G : 2.000

Fig. 4 : Hyphe (M) dégradant la paroi lignifiée d'un
vaisseau.

Fix. Os O₄

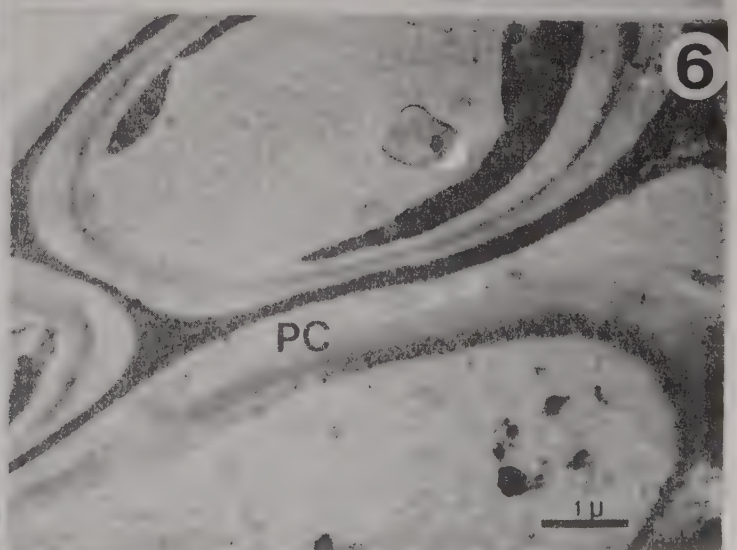
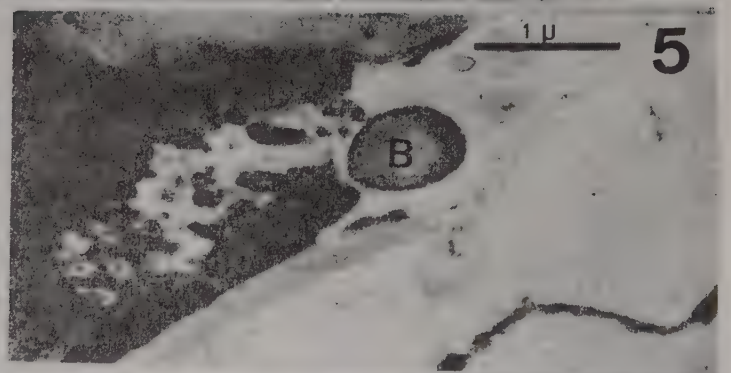
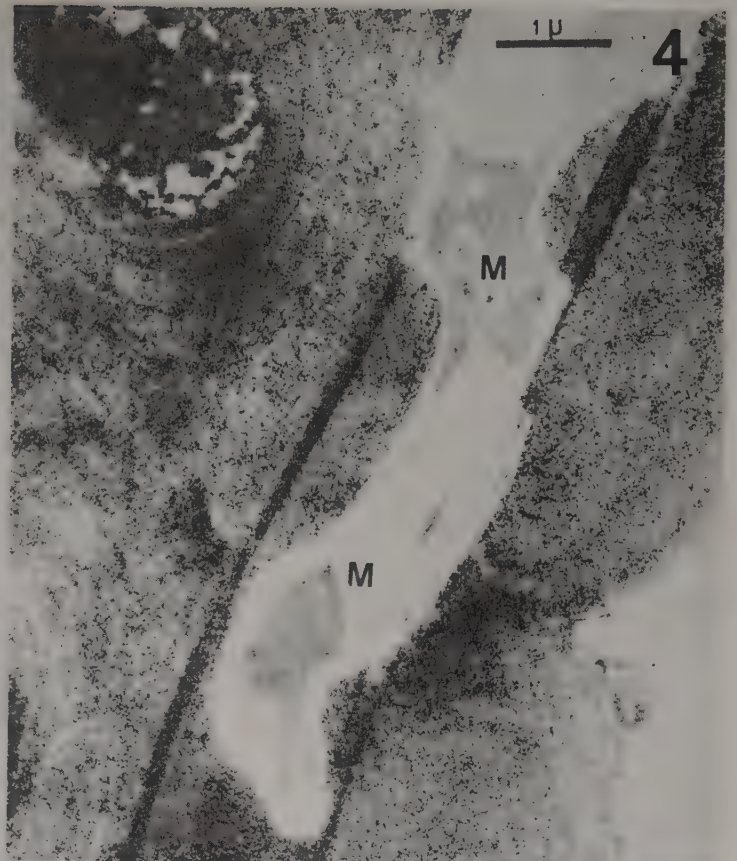
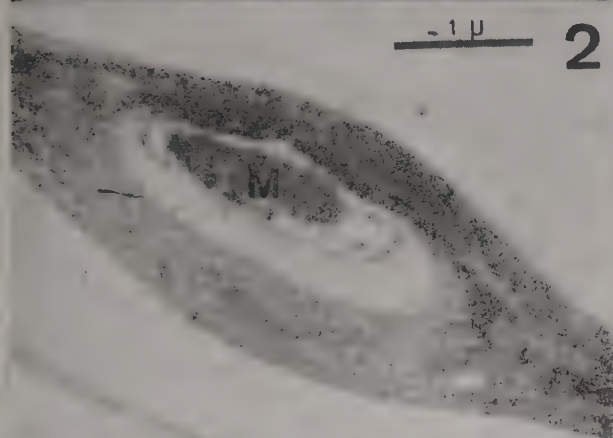
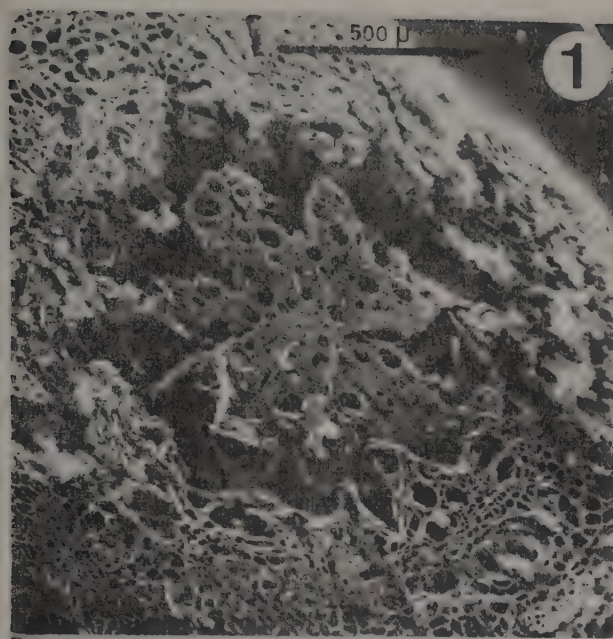
G : 15.000

Fig. 5 : Bactérie (B) s'attaquant aux parois de l'hôte
(THIERY).

G : 19.000

Fig. 6 : Coupe transversale dans les tissus lignifiés.

G : 12.000



P L A N C H E XIII

C. coccodes : Les sclérotés

=====

Fig. 1 : Macrophotographie d'une racine adulte de Tomate présentant les symptômes du "Black dot". Les flèches indiquent des acervules.

Fig. 2 : Macrophotographie d'une racine de plantule inoculée "*in vitro*" et présentant des sclérotés.

Fig. 3 : Aspect en M.F.B. d'un sclérote obtenu sur milieu de culture gélosé.

G : 1300

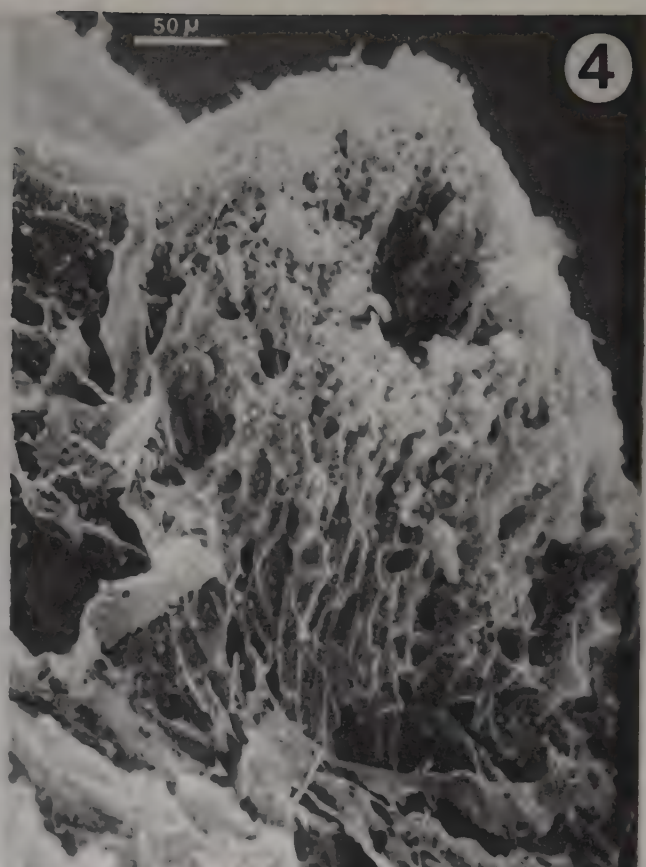
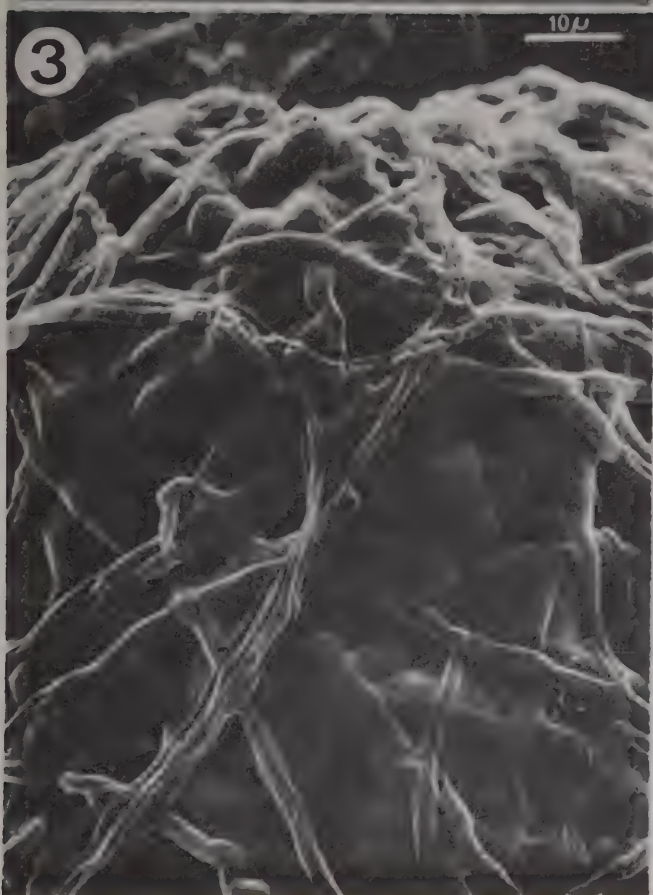
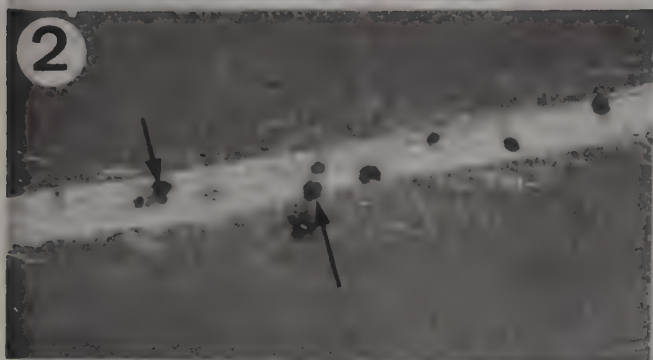
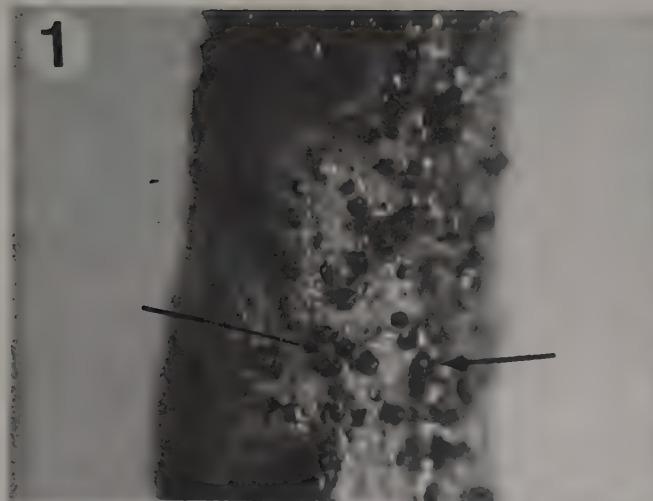
Fig. 4 : Sclérote desséché à la surface d'une racine de plante adulte (M.F.B.).

G : 600

Fig. 5 : Coupe transversale d'un sclérote situé dans le cortex d'une racine de plantule.

Fix. Os O₄ Technique de GOMORI-SWIFT.

G : 9.200



P L A N C H E XIV

C. coccodes : Acervules observées sur des racines
de plantes adultes provenant de serre

=====

Fig. 1 : Soies stériles et lisses émergeant à travers
le cortex de la racine (M.E.B.).

G : 8.000

Fig. 2 : Acervule avec des conidies (M.E.B.).

G : 1.200

Fig. 3 : Appareil sporifère (M. photonique).

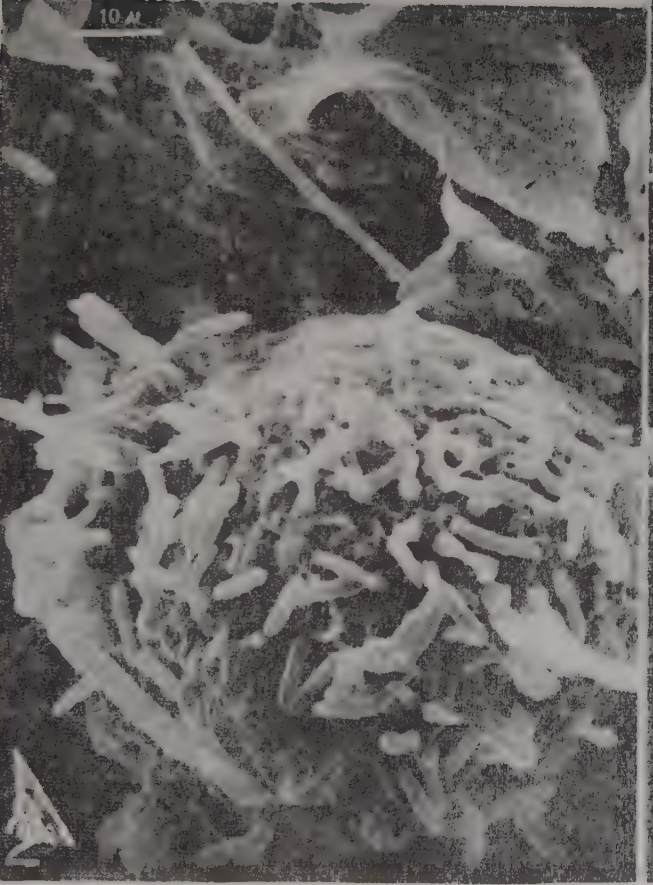
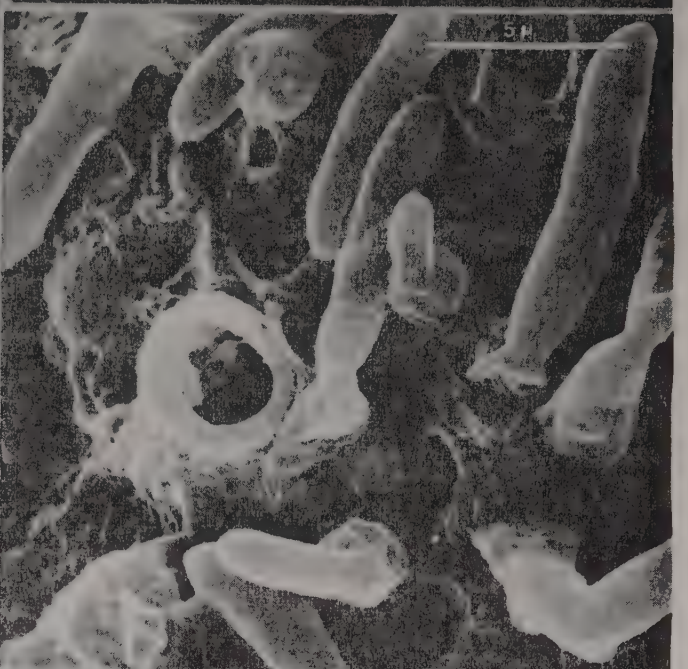
G : 1.200

Fig. 4 : Détail montrant des conidies extrudées à
travers le mucilage (M.E.B.).

G : 5.400

Fig. 5 : Acervule à la surface d'une racine (M.E.B.).

G : 1.100



P L A N C H E XV

C. coccodes : Acervules obtenues sur milieux
artificiels (M.E.B.)

=====

Fig. 1 : Jeune acervule obtenue sur tranche de Pomme
de terre non stérile.

G : 1.700

Fig. 2 : Acervule obtenue sur milieu à la farine
d'avoine gélosée.

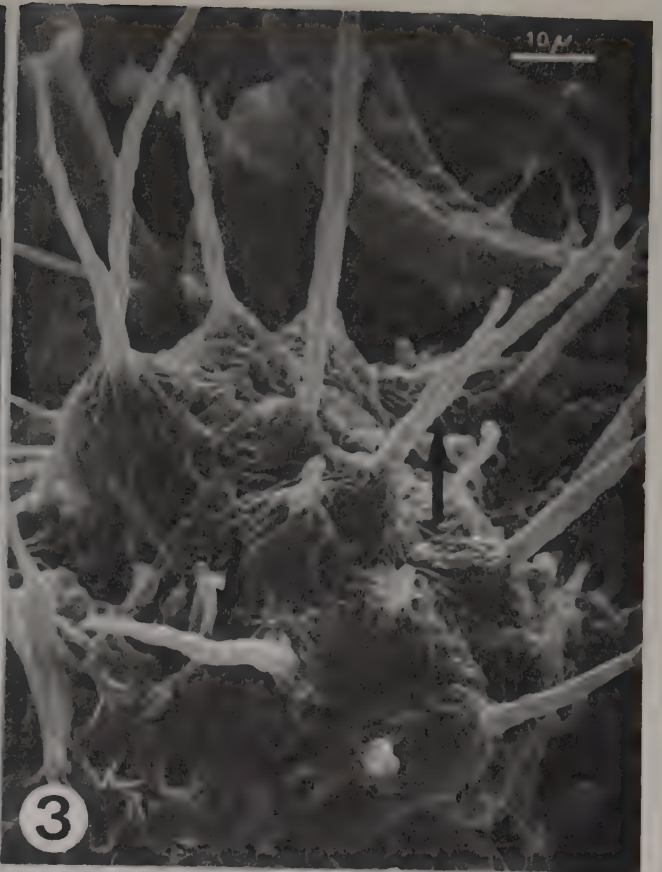
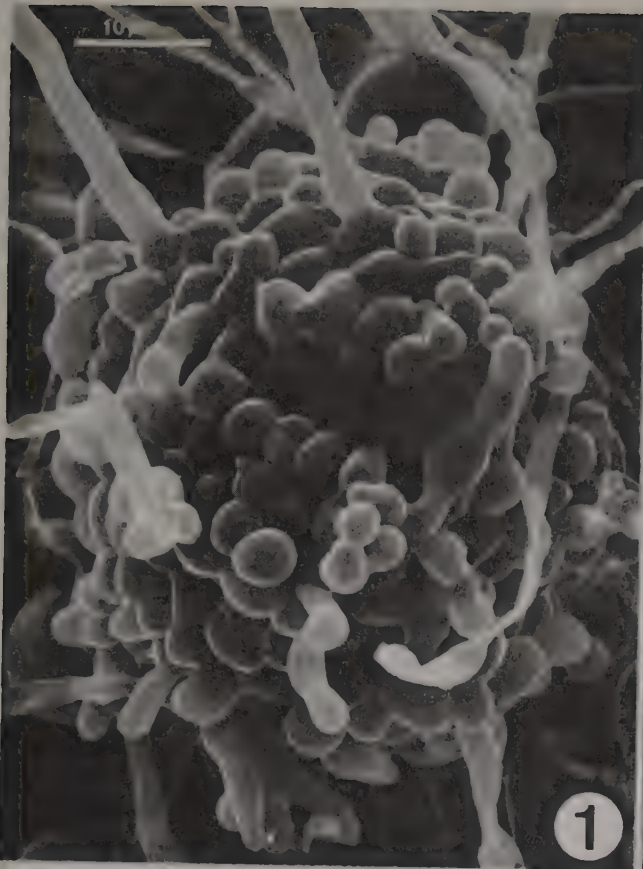
G : 350

Fig. 3 : Apparition de soies sur un sclérote. Noter
les annellations des jeunes soies (flèches).

G : 1.100

Fig. 4 : Détail montrant les annellations d'une soie.

G : 2.400



P L A N C H E XVI

C. coccodes : Les appressoria

=====

Fig. 1 : Conidie (co) présentant une cloison et ayant formé un appressorium (ap). (M.E.B.).

G : 1.100

Fig. 2 et 5 : Appressoria observés sous des angles différents (M.E.B.).

Fig. 2 : G : 13.000

Fig. 5 : G : 16.000

Fig. 3 : Conidie ayant formé un appressorium (ap) de couleur sombre à un pôle et un tube germinatif normal à l'autre pôle (M. photonique).

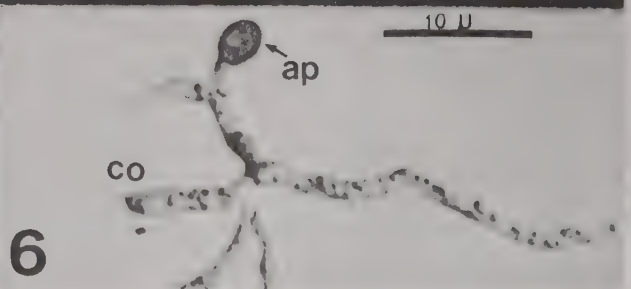
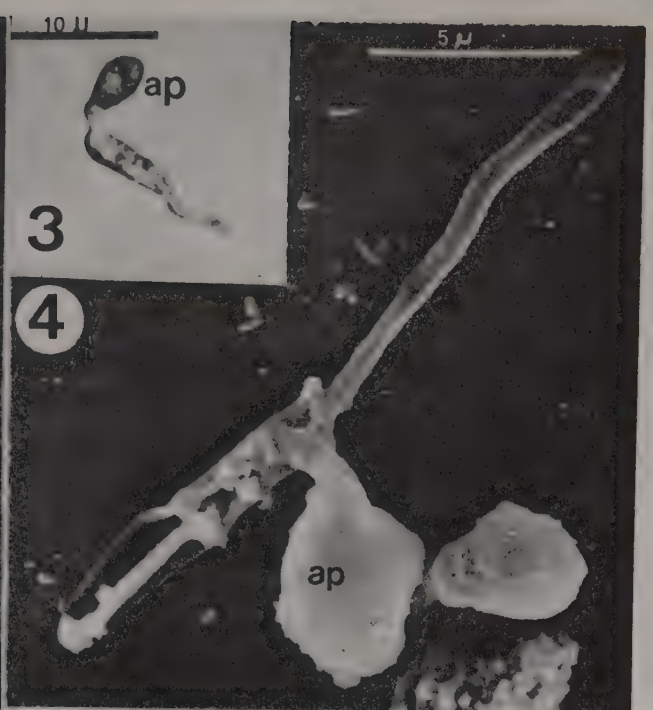
G : 2.000

Fig. 4 : A un même pôle, on observe la formation d'un appressorium (ap) et d'un tube germinatif (M.E.B.).

G : 5.600

Fig. 6 : Germination unipolaire avec ramification du tube germinatif et formation d'un appressorium (ap) (M. photonique).

G : 2.000



P L A N C H E XVII

C. coccodes : Mycélium et sclérotés

====

Fig. 1 : Hyphe intramatricielle présentant une cloison (S) typique des Ascomycètes. Une couche mucilagineuse importante délimitée extérieurement par une couche A enveloppe l'hyphe.

Fix. KMnO_4

G : 23.000

Fig. 2, 3, 4 et 5 : Coupes transversales de sclérotés obtenus sur milieu gélosé.

Fig. 2 : coupe semi-fine (M. photonique)

Fig. 3 : localisation différentielle des substances protéiques (GOMORI-SWIFT)

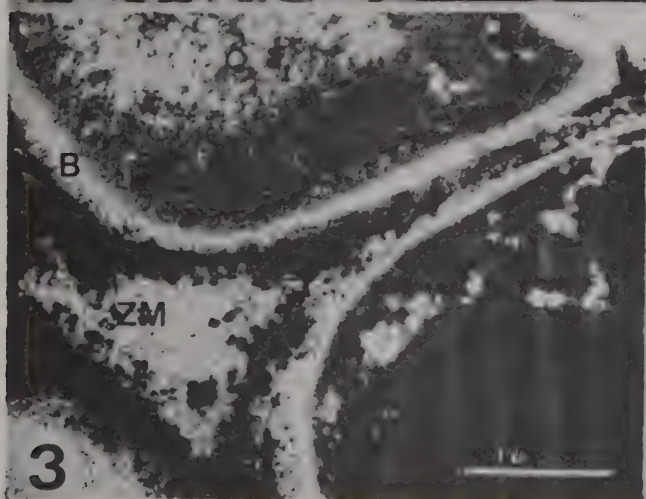
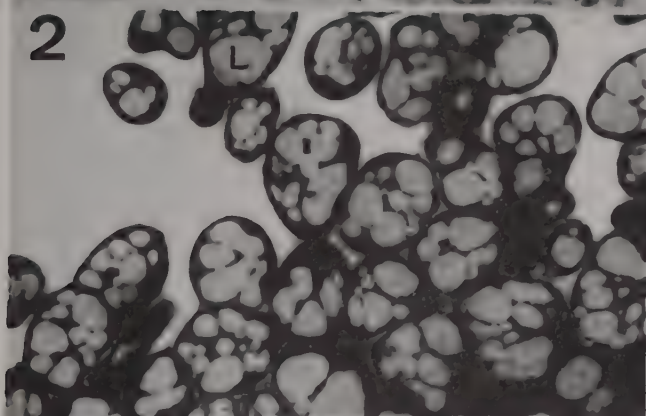
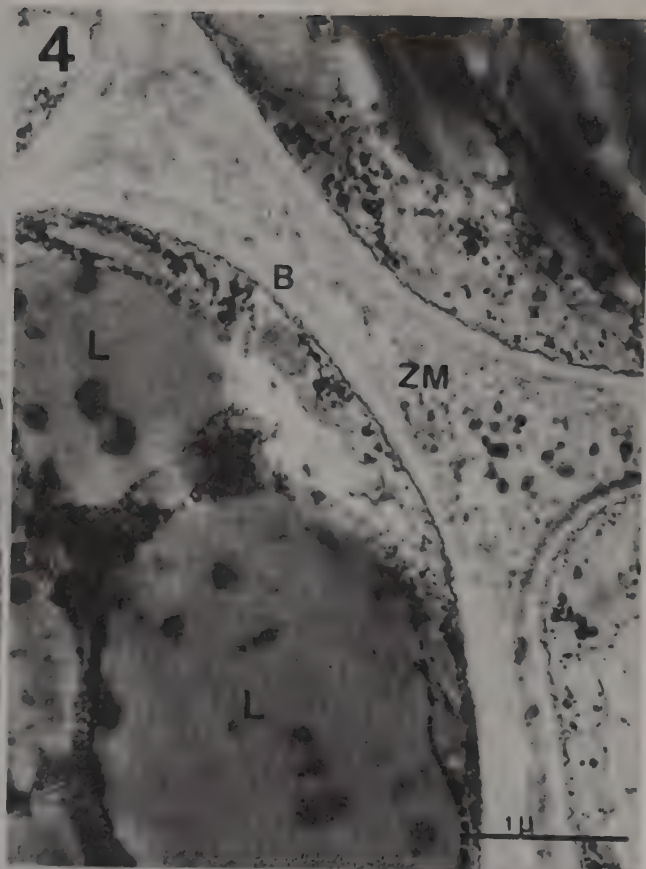
G : 19.000

Fig. 4 : localisation différentielle des substances polysaccharidiques (THIERY)

G : 22.000

Fig. 5 : aspect des sclérotés par simple coloration par le citrate de plomb.

G : 20.000



P L A N C H E XVIII

C. coccodes : Pénétration des cellules corticales

=====

Fig. 1 : Lignituber (Li) très altéré, traversé par une hyphe (M). Noter la présence d'une zone stratifiée et dense aux électrons (flèches) située entre la paroi (PC) et le lignituber.

Fix. Os O₄

G : 20.000

Fig. 2 : Coupe transversale d'un lignituber (Li) dans une cellule vivante.

Fix. Os O₄

G : 18.000

Fig. 3 : Passage d'une hyphe à travers un lignituber dans une cellule dont le contenu est dégradé.

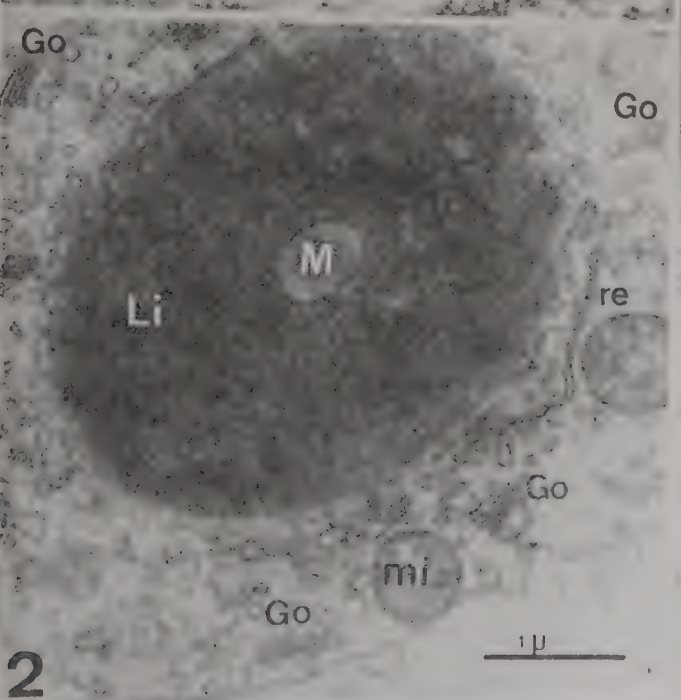
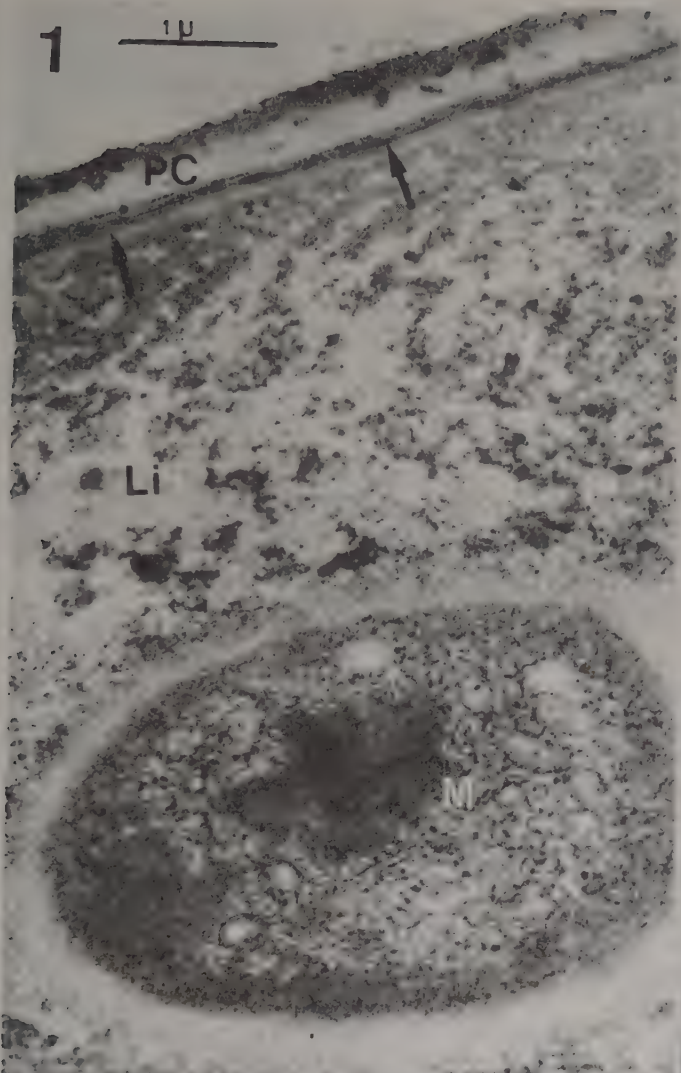
Fix. Os O₄

G : 9.200

Fig. 4 : Coupe longitudinale d'un lignituber, montrant sa structure stratifiée.

Fix. Os O₄

G : 23.000



P L A N C H E XIX

C. coccodes : Mise en évidence des substances
protéiques dans les cellules corticales parasitées
(GOMORI-SWIFT)

=====

Fig. 1 : Cellule saine : réaction intense au niveau de la paroi et des dépôts pariétaux à proximité du champignon (flèche de gauche) et absence de réaction au niveau de la paroi de la cellule plus éloignée (flèche de droite).

Fix. Os O₄

G : 4.500

Fig. 2 : Lignituber (Li) fortement réactif. Paroi fongique (flèches) peu dense aux électrons

Fix. Os O₄

G : 24.000

Fig. 3 : Détail d'une paroi et de dépôts pariétaux dans des cellules vivantes proches du parasite.

Fix. Os O₄

G : 23.000

Fig. 4 : "Microbodies" dont le centre d'aspect cristallin est très dense aux électrons.

Fix. Os O₄

G : 23.000



P L A N C H E X X

C. coccodes : Réactions des cellules hôtes

=====

Fig. 1 : Hyphe située dans une cellule altérée contenant de nombreuses particules denses (P_1 et P_2). Les cellules vivantes de l'hôte réagissent à l'infection par déformation de leur plasmalemme (mc) et apparition de dépôts pariétaux (DP) (cellule de gauche), puis par la rupture du plasmalemme et du tonoplaste (cellule de droite), seules les mitochondries et des formations vésiculaires subsistent.

Fix. Os O_4

G : 9.000

Fig. 2 : Lignituber (Li) situé dans une cellule dont le protoplasme est détruit. Noter une matrice constituée de substances denses (sd) entre la cellule fongique et la cellule hôte.

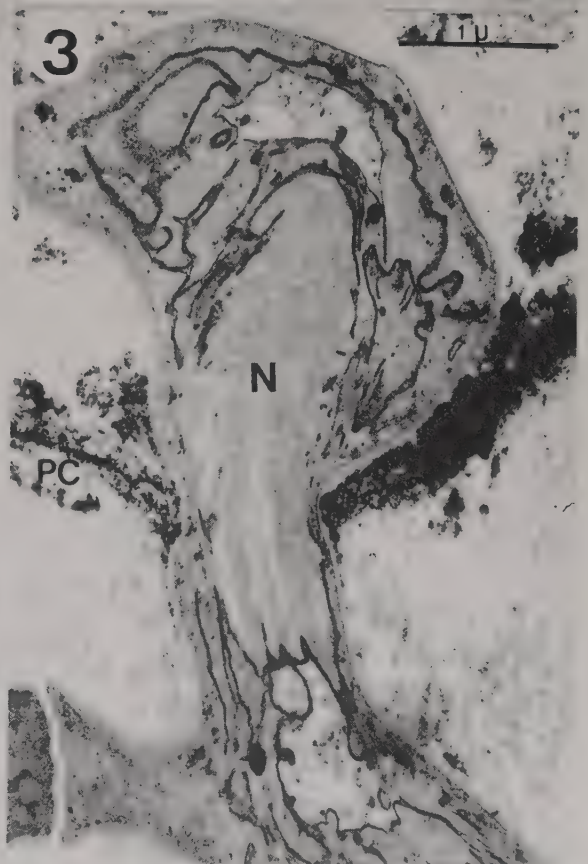
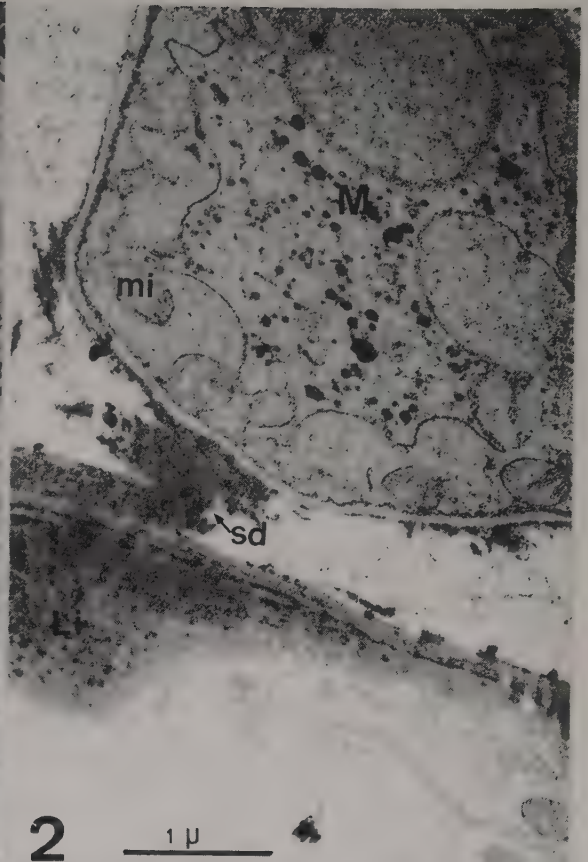
Fix. Os O_4

G : 19.000

Fig. 3 : Perforation de la paroi (PC) de cellules mortes. Noter la constriction de l'hyphe à ce niveau.

Fix. $KMnO_4$

G : 21.000



P L A N C H E XXI

C. coccodes : Réactions des cellules-hôtes

=====

Fig. 1 : Dépôt pariétal (DP) entre la paroi (PC) de l'hôte et le plasmalemma (mc) d'une cellule vivante. Le réticulum endoplasmique (re) est abondant.

Fix. Os O₄

G : 60.000

Fig. 2 : Cellules corticales situées à proximité du parasite et montrant une augmentation de la taille du noyau (N) dont le nucléole est bien visible. Noter l'abondance des organites (mi, mo, pl...).

Fix. Os O₄

G : 20.000

Fig. 3 : Cellule hôte présentant une densité importante d'organites et en particulier de réticulum endoplasmique(re) de type granulaire et de nombreux polyribosomes (r).

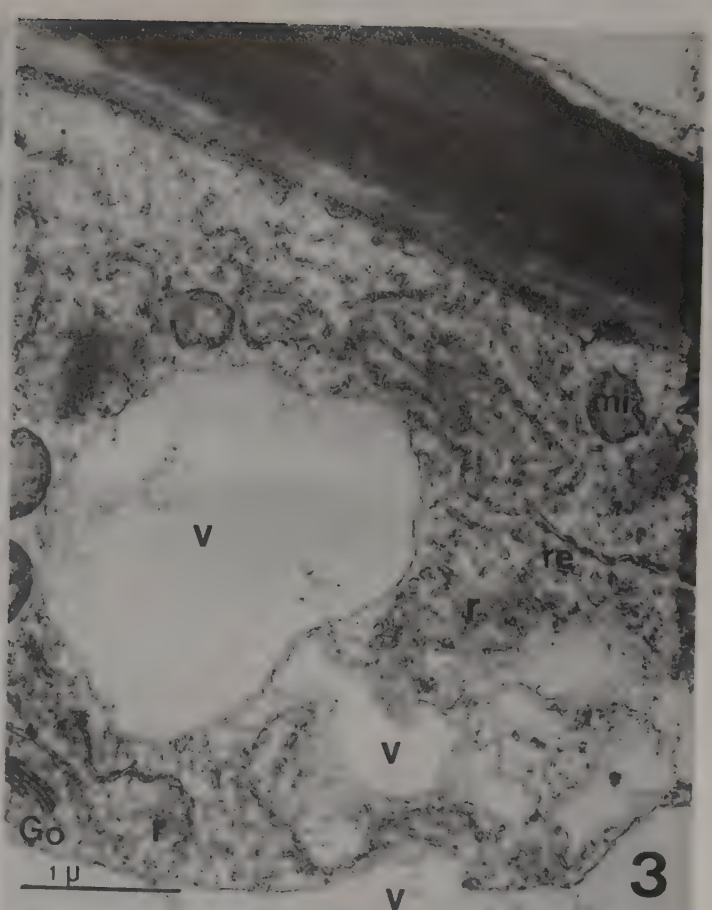
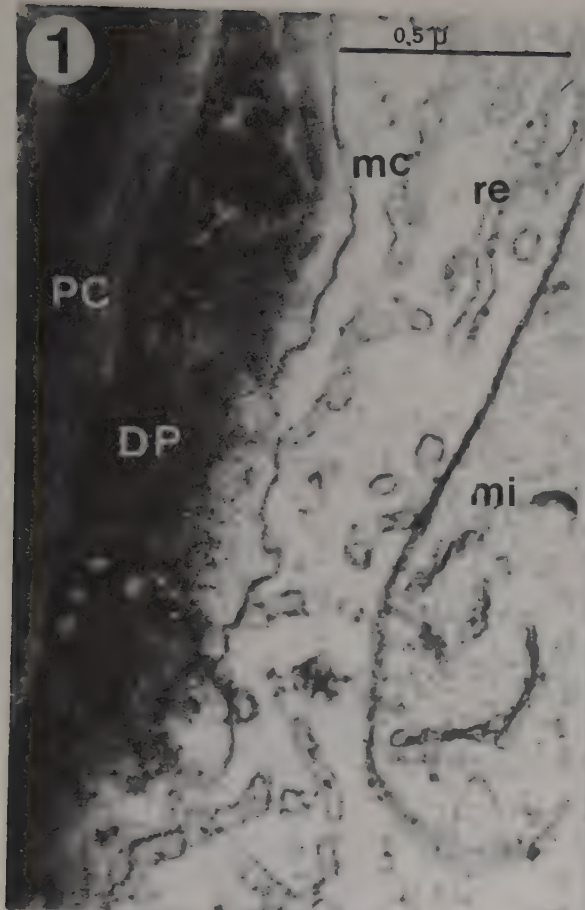
Fix. Os O₄

G : 21.000

Fig. 4 : Microphotographie montrant l'élaboration de dépôts pariétaux (DP) de part et d'autre de la paroi cellulaire (PC). Noter dans le cytoplasme les nombreux dictyosomes (Go) et l'abondance des formations vésiculaires (ve).

Fix. Os O₄

G : 22.000



P L A N C H E XXII

C. coccodes : Mise en évidence des substances
de nature polysaccharidique (THIERY)

(A. périodique, T.C.H. -6h-, Protéinate d'Ag)

=====

Fig. 1 : Cellule corticale à proximité du parasite, révélant une activité golgienne (Go) importante. Les dictyosomes (Go) situés près de la paroi produisent des vésicules fortement contrastées. Le plasmalemme est lui aussi très dense aux électrons.

G : 22.000

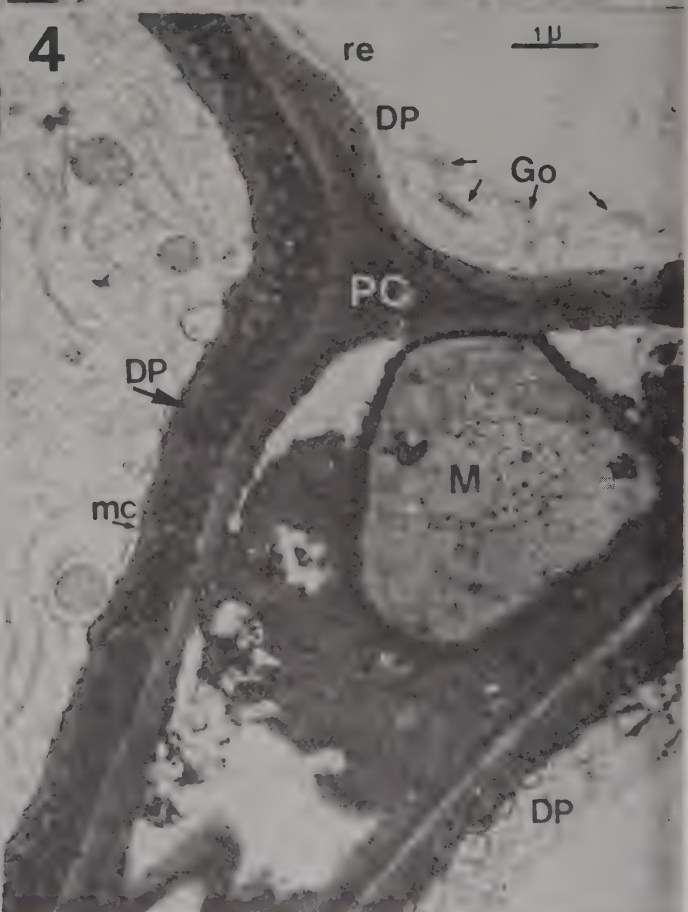
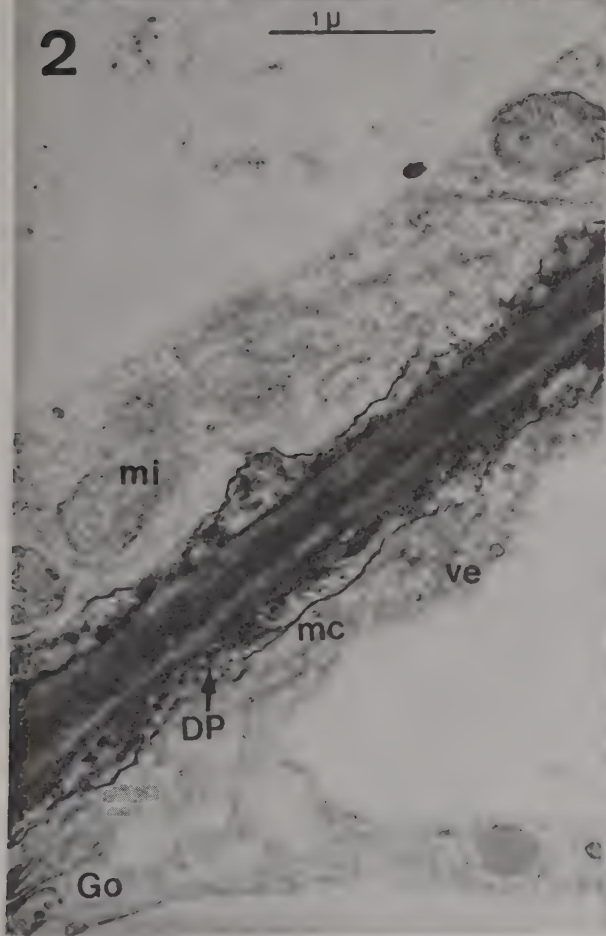
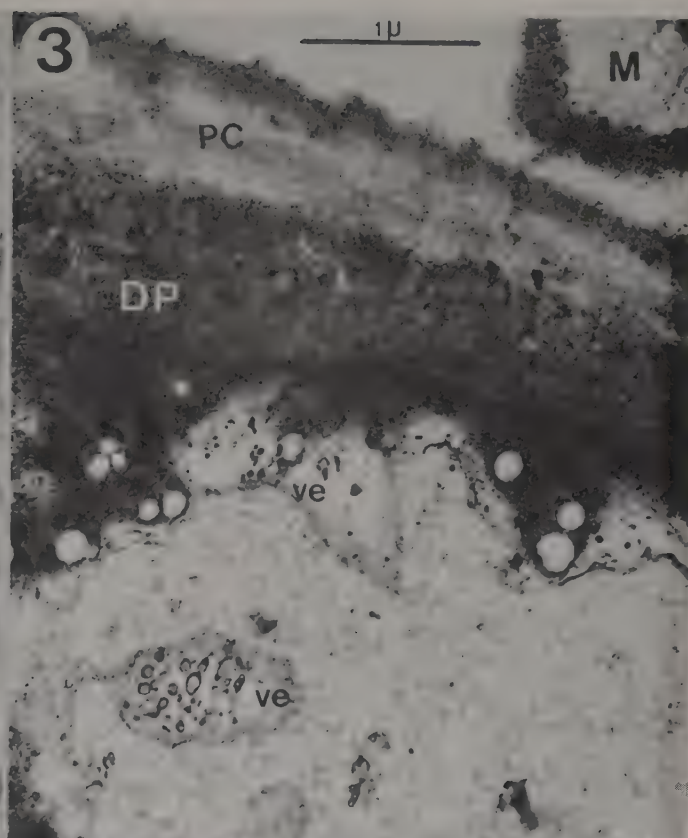
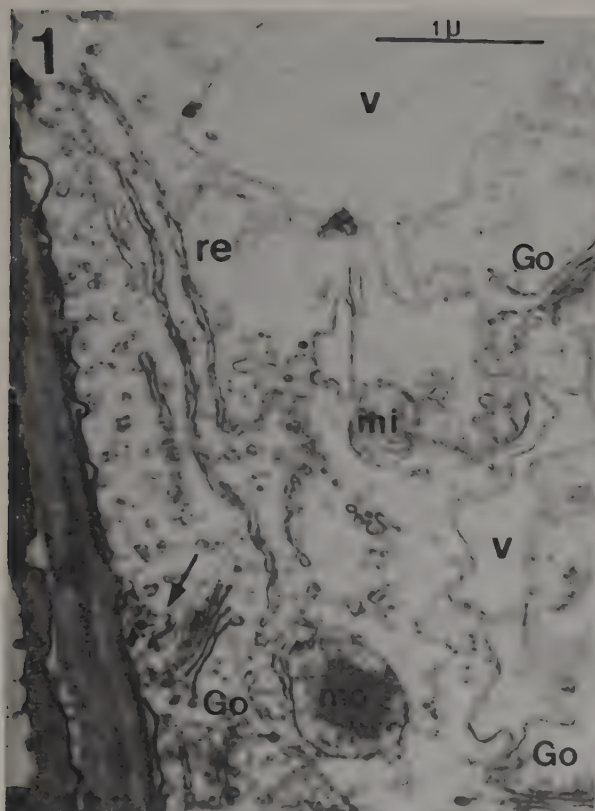
Fig. 2 et 4 : Apparition de dépôts pariétaux (DP) très denses aux électrons, entre le plasmalemme (mc) et la paroi (PC) de cellules vivantes.

Fig. 2 : G : 22.000

Fig. 4 : G : 11.000

Fig. 3 : Vésicules (ve) contenant des matériaux de nature polysaccharidique, très denses aux électrons, migrant vers ou depuis le dépôt pariétal (DP) situé dans une cellule en contact avec le parasite (M).

G : 24.000



P L A N C H E XXIII

C. coccodes : Racines mortes de plantes adultes

=====

Fig. 1 : Hyphe vivante (M) dans une cellule morte contenant des particules denses et bactéries (B).

Fix. Os O₄

G : 33.000

Fig. 2 : Hyphes (M) dont le contenu est altéré et où seule l'enveloppe externe subsiste. On remarque également quelques bactéries (B).

Fix. Os O₄

G : 20.000

Fig. 3 : Cellules racinaires dont la lumière est remplie de nombreuses particules denses et bactéries. La paroi cellulaire (PC) est fortement marquée par les réactifs de GOMORI-SWIFT et est délimitée par une zone plus claire.

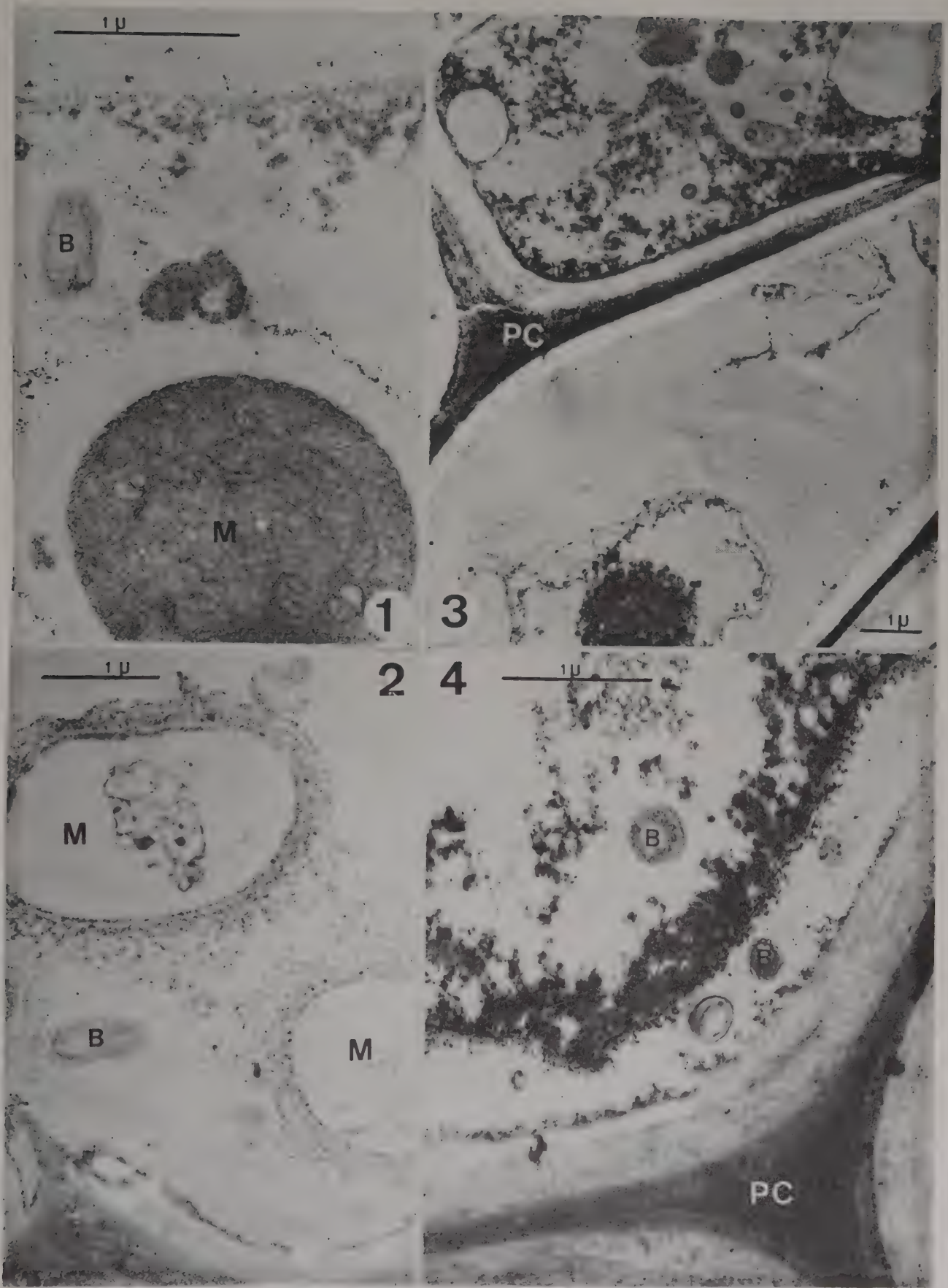
Fix. Os O₄ + GOMORI-SWIFT

G : 11.000

Fig. 4 : Microphotographie montrant l'épaississement de la paroi cellulaire de l'hôte par un dépôt moins dense aux électrons. Dans la lumière de la cellule, on remarque de nombreuses substances denses aux électrons et bactéries (B).

Fix. Os O₄

G : 27.000



NOM DE L'ETUDIANT : DELON René

NATURE DE LA THESE : DOCTEUR INGENIEUR

VU, APPROUVE

& PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 17 mai 1974

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



J.R. HELLOY

